

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW  
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW  
I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 94**

Numer 94

**Volume XIII**

Rok XIII

**SEPTEMBER 2010**

WRZESIEŃ 2010

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**

WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Cracow**

Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL  
COMMITTEE:**

KOMITET

REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**

Redaktor naczelny

**Jan Chłopek**

**Editor**

Redaktor

**Elżbieta Pamuła**

**Secretary of editorial**

Sekretarz redakcji

**Design**

Projekt

**Katarzyna Trała**

**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF**

**EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**

**30/A3, Mickiewicz Av.**

**30-059 Cracow, Poland**

Akademia

Górnictwo-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

**Issue: 200 copies**

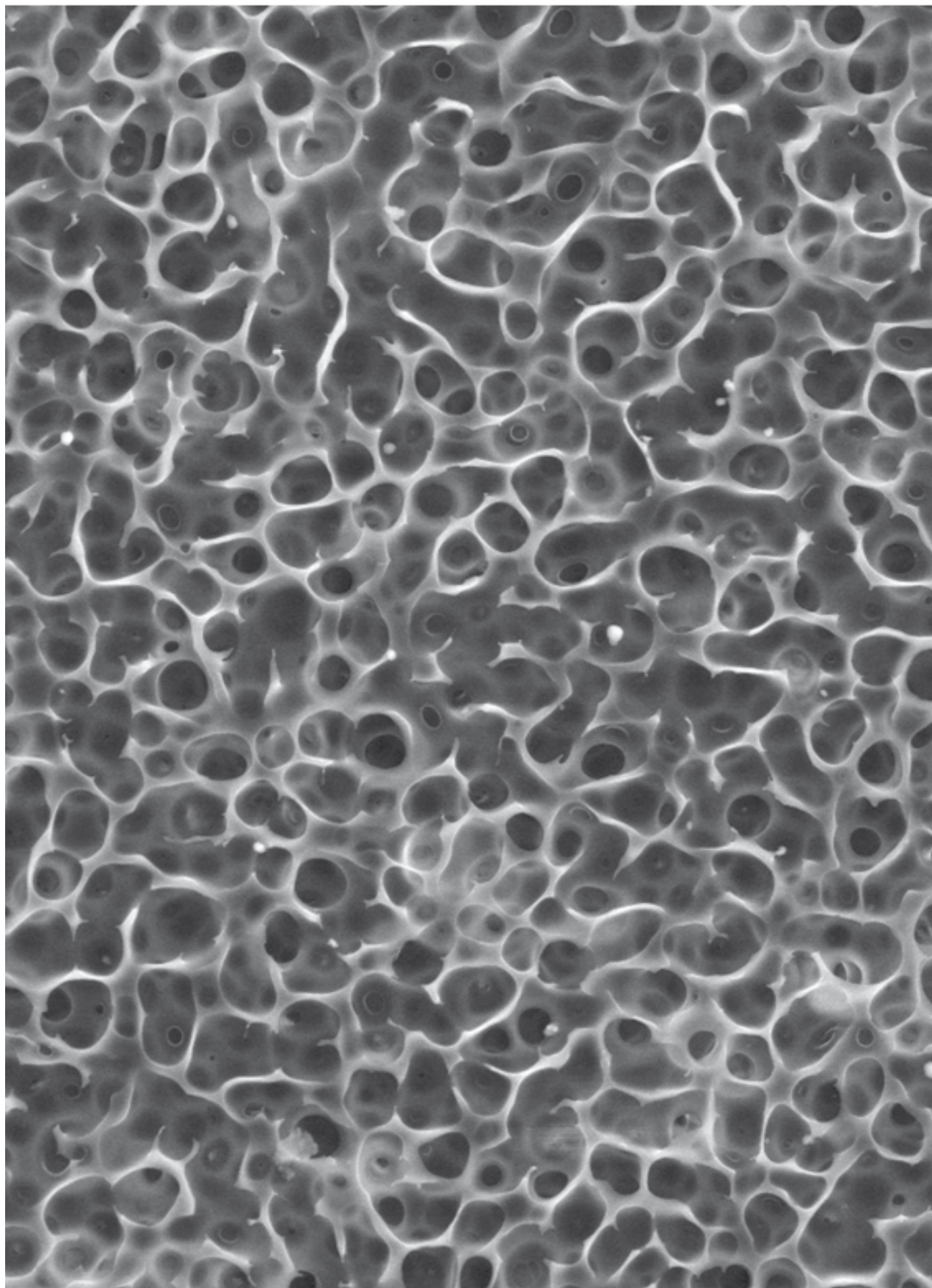
Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD**  
**MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

**Iulian Antoniac**

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

**Lucie Bacakova**

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

**Romuald Będziński**

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Stanisław Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Maria Borczuch-Łączka**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Wojciech Chrzanowski**

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

**Tadeusz Cieślik**

ŚŁĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

**Andrzej Górecki**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Robert Hurt**

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

**James Kirkpatrick**

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

**Wojciech Maria Kuś**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Małgorzata Lewandowska-Szumieł**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Jan Marcinia**

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Sergey Mikhalovsky**

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

**Stanisław Mitura**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**Roman Pampuch**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Stanisław Pielka**

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Vehid Salih**

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

**Jacek Składzień**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW

**Andrei V. Stanishevsky**

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

**Anna Ślósarczyk**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Tadeusz Trzaska**

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

**Dimitris Tsipas**

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzycznych obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl lub Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl,  
kabe@agh.edu.pl,  
Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl,  
www.biomat.krakow.pl

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:  
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41  
Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
Bank Śląski S.A. O/Kraków,  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001  
Opłaty: Cena 1 numeru wynosi 20 PLN

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office by e-mail to kabe@agh.edu.pl, or Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl
4. A manuscript should be organized in the following order:
  - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
AGH University of Science and Technology  
Faculty of Materials Science and Ceramics  
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl,  
kabe@agh.edu.pl,  
Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl  
www.biomat.krakow.pl

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN  
Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Cracow, Poland  
Bank Slaski S.A. O/Krakow  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001



# *XX Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE*

*14-17 October 2010*

*Hotel "Perla Poludnia", Ryto*

**<http://galaxy.uci.agh.edu.pl/~apowroz/biomat/>**





## SPIIS TREŚCI

<b>SURFACE CHARACTERIZATION OF THE ELECTROSPUN CHITOSAN NANOFIBERS AFTER METHANE PLASMA TREATMENT</b> ZBIGNIEW ROŻEK, DANIELA LUBASOVÁ, JINDRICH MATOUSEK, PETR LOUDA, PIOTR NIEDZIELSKI, STANISŁAW MITURA	<b>2</b>
<b>IN VITRO EVALUATION OF POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MEMBRANE</b> M. KROK, R. HESS, I. WOJAK, D. KOŚCIELNIAK, D. SCHARNWEBER, E. PAMUŁA	<b>7</b>
<b>HUMAN OSTEObLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON NANOFIBROUS PLGA MEMBRANES LOADED WITH NANODIAMONDS</b> MARTIN PARIZEK, TIMOTHY E. L. DOUGLAS, ALEXANDER KROMKA, ANDREA RENZING, ESKE VOSS, MARIEA A. BRADY, PATRICK H. WARNKE, LUCIE BACAKOVA	<b>11</b>
<b>PRZEDKLINICZNE TESTY ENDOPROTEZ STAWU BIODROWEGO Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH</b> ANNA MARIA RYNIEWICZ, TOMASZ MADEJ	<b>14</b>
<b>WPŁYW PROMIENIOWANIA ELEKTRONOWEGO NA BIORESORBOWALNE TERPOLIMERY ZAWIERAJĄCE PAKLITAKSEL</b> MONIKA MUSIAŁ-KULIK, JANUSZ KASPERCZYK, KATARZYNA JELONEK, KATARZYNA GĘBAROWSKA, HENRYK JANECZEK, PIOTR DOBRZYŃSKI	<b>24</b>

*STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS  
ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS*

## CONTENTS

<b>SURFACE CHARACTERIZATION OF THE ELECTROSPUN CHITOSAN NANOFIBERS AFTER METHANE PLASMA TREATMENT</b> ZBIGNIEW ROŻEK, DANIELA LUBASOVÁ, JINDRICH MATOUSEK, PETR LOUDA, PIOTR NIEDZIELSKI, STANISŁAW MITURA	<b>2</b>
<b>IN VITRO EVALUATION OF POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MEMBRANE</b> M. KROK, R. HESS, I. WOJAK, D. KOŚCIELNIAK, D. SCHARNWEBER, E. PAMUŁA	<b>7</b>
<b>HUMAN OSTEObLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON NANOFIBROUS PLGA MEMBRANES LOADED WITH NANODIAMONDS</b> MARTIN PARIZEK, TIMOTHY E. L. DOUGLAS, ALEXANDER KROMKA, ANDREA RENZING, ESKE VOSS, MARIEA A. BRADY, PATRICK H. WARNKE, LUCIE BACAKOVA	<b>11</b>
<b>PRECLINICAL TESTS OF ENDOPROSTHESES OF HIP JOINT USING FINITE ELEMENT METHODS</b> ANNA MARIA RYNIEWICZ, TOMASZ MADEJ	<b>14</b>
<b>THE INFLUENCE OF ELECTRON BEAM RADIATION ON BIORESORBABLE TERPOLYMERS CONTAINING PACLITAXEL</b> MONIKA MUSIAŁ-KULIK, JANUSZ KASPERCZYK, KATARZYNA JELONEK, KATARZYNA GĘBAROWSKA, HENRYK JANECZEK, PIOTR DOBRZYŃSKI	<b>24</b>

*WYDANIE DOFINANSOWANE PRZESZ MINISTRA NAUKI  
I SZKOLNICTWA WYŻSZESZ  
EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE  
AND HIGHER EDUCATION*

# SURFACE CHARACTERIZATION OF THE ELECTROSPUN CHITOSAN NANOFIBERS AFTER METHANE PLASMA TREATMENT

ZBIGNIEW ROŻEK<sup>1\*</sup>, DANIELA LUBASOVÁ<sup>2</sup>, JINDRICH MATOUSEK<sup>3</sup>, PETR LOUDA<sup>4</sup>, PIOTR NIEDZIŁSKI<sup>5</sup>, STANISŁAW MITURA<sup>6</sup>

<sup>1,4</sup> INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC, 2 STUDENTSKÁ ROAD, 461 17 LIBEREC 1, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup> FACULTY OF TEXTILE ENGINEERING, DEPARTMENT OF NONWOVENS, TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC, 2 STUDENTSKÁ ROAD, 461 17 LIBEREC 1, CZECH REPUBLIC

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF PHYSICS, FACULTY OF SCIENCE, J.E. PURKINJE UNIVERSITY, 8 CESKE MLADZEZE ROAD, 400 96 USTI NAD LABEM, CZECH REPUBLIC

<sup>5,6</sup> INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, 1 STEFANOWSKIEGO ROAD, 90-924 LODZ, POLAND

\*E-MAIL: ZBYNEKROZEK@SEZNAM.CZ

## Abstract

*Present nanofiber technology is one of the most important objects in the recent research topics. Electrospinning is a unique technology that can produce non-woven fibrous materials with interesting characteristics such as diameters ranging from sub-micron to several nanometers, high surface to volume ratio, high porosity and small interfibrous pore size. Polymer nanofibres have great potential for technical applications in filtration, composites and electronics. Nanofibers are also of importance in many different applications as the drug delivery, biomaterials and tissue engineering. For these applications there is a great need for polymer nanofibers with well defined surface properties. In this field, plasma surface treatment has been applied in the textile industry for the modification of polymer nanofibers.*

*In this study, chitosan nanofibers were prepared by modified electrospinning method called Nanospider™ and treated with plasma in the presence of methane gas. The surface characteristics of the nanofibers after plasma treatment were examined using contact angle measurements, SEM and XPS analysis.*

**Keywords:** electrospinning, electrospun nanofibers, plasma treatment, hydrophobicity

[*Engineering of Biomaterials*, 94, (2010), 2-6]

## Introduction

Nanoscale materials have attracted great academic and industrial interest in recent years. In this field, electrospinning is a straightforward method to produce fibers with nano/micro scaled diameters [1,2]. This is a simple and highly effective technique for the preparation of polymer fibers in the form of individual fibers or of non-woven fiber mats [3]. Microstructural properties of this material include high porosity with very small pore size, interconnectivity and controllable mesh thickness. All these properties, together with the large surface area to volume ratio make the nonwoven fiber mats a suitable material for different applications such as

biosensor/chemosensor [4,5], reinforced nanocomposites [6] electronic and semi-conductive materials [7,8] and filters [9]. Moreover, electrospun fiber mats can be a promising material for many important biomedical applications, including artificial blood vessels [10], wound dressings [11], the drug delivery and scaffolds for tissue engineering [12].

Especially from the point of view of the biomedical applications, there is a significant need and demand for the polymer nanofiber mats with well defined surface properties. In this case, it seems that the most important aspect is hydrophilicity/hydrophobicity balance. Currently gas plasma treatment processes are extensively used to increase the hydrophilicity of hydrophobic nonwoven fiber mats. It has been reported that the hydrophilicity of silk fibroin nanofibers or nanofibers made of poly( $\epsilon$ -caprolactone) was increased meaningfully after an O<sub>2</sub> plasma treatment. Such modification of these materials resulted in an improved fibroblasts adhesion and proliferation [13,14]. On the other hand, CF<sub>4</sub> or CH<sub>4</sub> plasma treatment increased the hydrophobicity of the nanofibers made of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) or poly[bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphazene], respectively [15,16]. Hydrophobicity is an important property of a surface of different materials for practical applications [17]. Superhydrophobic surfaces have great attention due to their interesting properties, such as their self-cleaning, and antifouling properties. Kitahara et al. modified the cotton fibres with plasma in the presence of hydrocarbon gas and investigated the antibacterial activities of the modified samples. It has been established that plasma modified samples had antibacterial property in contact with *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* [18].

Many of the scientific facts mentioned above have persuaded the authors of this paper to modify the chitosan nonwoven nanofiber mesh with plasma in the presence of methane gas. Chitosan is a biosynthetic polysaccharide comprising of deacetylated chitin. Chitin is a naturally occurring  $\beta$ -1,4 linked polymer of 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose polysaccharide that can be extracted from crustacean exoskeletons or generated via a fungal fermentation process. Chitosan is a  $\beta$ -1,4 linked polymer of 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose that is soluble in an aqueous solution of acids. Past research has shown that chitosan is biocompatible and biodegradable and does not induce any strong immune response. Additional positive features are its low cost due to abundance and diverse methods that enable the chemical processing of this polymer [19].

In this study the chitosan nanofiber mats with a hydrophilic character were prepared by modified electrospinning method called Nanospider™ and treated with plasma in the presence of methane gas. The surface properties of the plasma-treated nanofibers were characterized by water contact angle (WCA), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

## Materials and methods

### Materials and preparation of solution for electrospinning

Chitosan-5 was purchased from Wako Pure Chemical Industries. PEO with a molecular weight ( $M_w$ ) 900 kD and surfactant Triton®X-100 were obtained from Aldrich. Deionized water with sodium chloride was used to prepare PEO solution. Sodium chloride was used by adding salt together with a water solution of 5 wt% PEO solution in concentrations 0.24 mol/L. Chitosan was dissolved in 10 wt% citric acid to achieve a polymer concentration of 8 wt%. PEO was dissolved in water with sodium chloride to achieve a polymer concentration of 5 wt%. Chitosan solutions and PEO solutions were prepared separately.

Both solutions were then mixed and stirred again at room temperature overnight in the volume ratios 9/1 (chitosan/PEO). The surfactant Triton®X-100 was added in concentration 2 wt% into solution.

### Electrospinning of nanofibers

Chitosan nanofibers have been prepared by modified electrospinning method called Nanospider™. The scheme of Nanospider™ system is shown in FIG. 1.

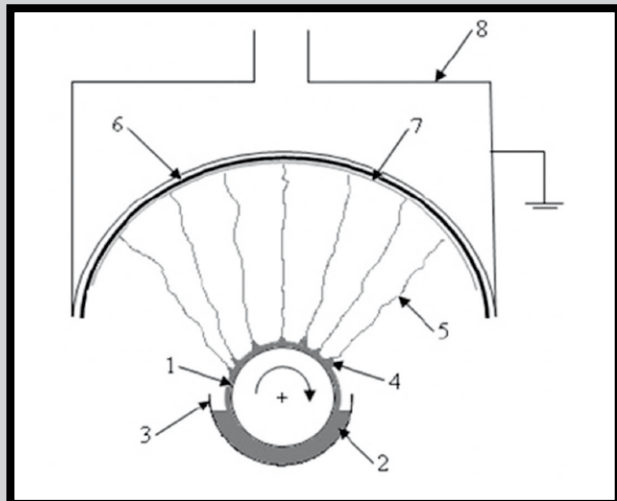


FIG. 1. The scheme of Nanospider™ system.

The metal roller (1), which serves as the positive electrode, raises a thin film of polymer solution (2). The so-called Taylor cones (4) are then formed due to the effect of applied high voltage. The method is based on the possibility of creating Taylor cones from a thin layer of polymer solution. The cones cleave into fibers (5), which are carried onto the negative electrode (8) and retained on the polypropylene non-woven fabric (6). During this process, the solvent evaporates and the fibers become stretched at either ambient or elevated temperature. The reservoir (3) is filled with 20 ml of polymer solution and rotation of the metal roller (1) ensures its perfect coating with the solution. The Taylor streams are formed next to each other, throughout the entire length of the metal roller, resulting in the high production capacity of nanofiber sheet (7). Electrospinning of mixture of chitosan/PEO solutions is in this study carried out at a voltage of 50-55 kV, distance of electrodes 10 cm and air temperature 22°C.

Optimal conditions for heat treatment of nanofiber sheet prepared from chitosan/PEO solution after electrospinning were investigated [20]. A temperature of 130-140°C applied for 30 min was found to be optimal. In other case, nanofiber sheet was dissolved in water.

### Plasma treatment

For the plasma treatment a laboratory scale plasma system was used. The vacuum chamber was 345 mm in diameter and 360 mm in height. The system was equipped with a radio frequency generator operating at 13.56 MHz, connected with the inner electrode through an impedance matching unit. The substrates were mounted on the water cooled RF electrode, plasma reactor was evacuated, and methane gas was introduced into the reactor. In order to remove any other gases from inside the reactor, chamber was flushed with methane gas for 5 min. The negative self-bias voltage was varied in the range from 100 to 600 V.

### Characterization

Contact angles of all samples were measured at room temperature using a home-made apparatus equipped with a digital camera, which is connected to a computer. Measurements were performed by the sessile drop method with distilled water as test liquid. The volume of the water droplet for each measurement was kept at  $3 \times 10^{-9} \text{ m}^3$ . For each sample, six different measurements were taken and the average values for contact angles were calculated.

The morphology of the electrospun chitosan nanofibers was observed on a scanning electron microscope (SEM) (TESCAN – VEGA XMU) after gold coating.

The XPS measurements were performed with the hemispherical analyzer operated in FAT mode (Phoibos 100 from Specs). The photoelectron spectra were referenced to the aliphatic C1s peak at 285 eV. The elemental composition was calculated from survey spectra. The high resolution spectra were acquired to understand the chemical bonds on the surface of the samples.

### Results and Discussions

Changes in contact angles of chitosan nanofibers treated with the methane plasma as a function of negative self-bias voltage are shown in FIG. 2. The plasma treatment leads to hydrophobization of the originally hydrophilic chitosan nanofiber mats. The untreated film has water contact angle of 0° (the water drop was immediately absorbed into the sample) which increases and reaches a maximum value of 126° for the plasma treated sample at 400 V of negative bias. Further voltage increase resulted in the decrease of contact angle of the nanofiber mats. Hydrophobization of the chitosan nanofiber mats can be explained by the formation of hydrophobic moieties on nanofibers surfaces after the methane plasma treatment.

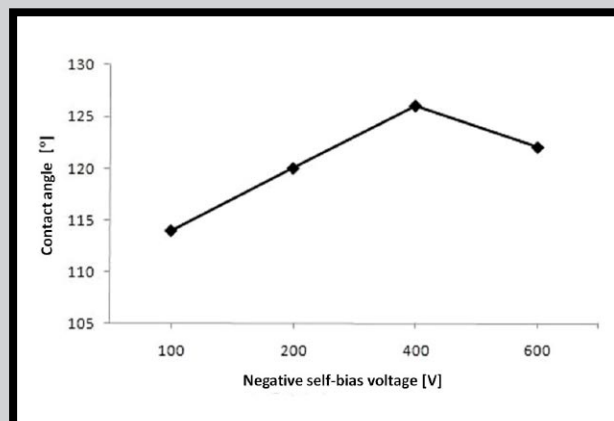
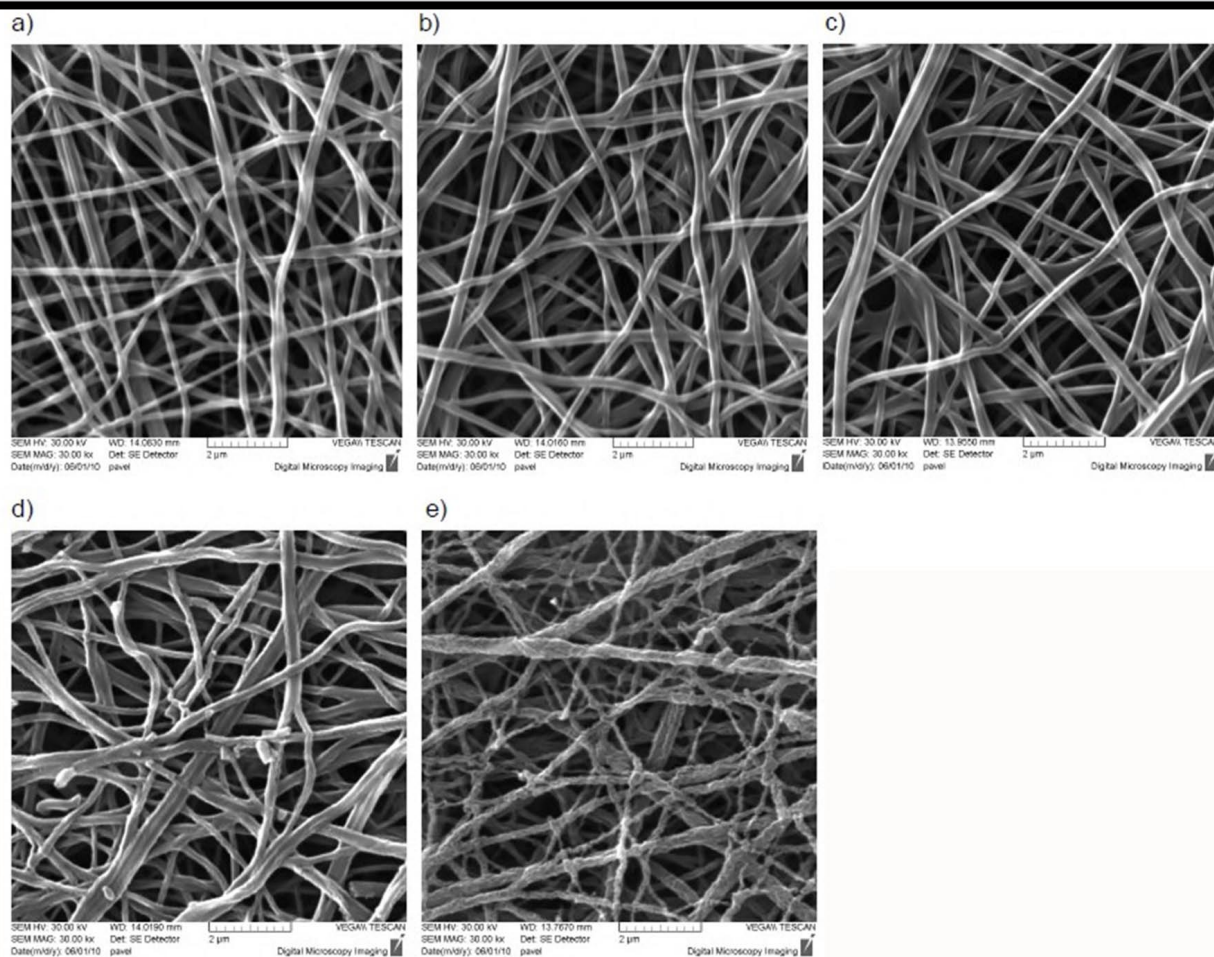


FIG. 2. Water contact angle of chitosan nanofibers versus negative self-bias voltage.

SEM images of both the modified and the non-modified chitosan fiber mesh were shown in FIG. 3. It can be seen that morphology of the nanofibers was not changed by methane plasma as the used negative self-bias voltage was varied in the range from 100 to 200 V. When voltage was changed from 200 to 600 V, the surface roughness of the nanofibers increased. This observation can be attributed to the etching effect of the plasma treatment and deposition of carbon from methane plasma on the surface of chitosan nanofibers. Strong interaction between the plasma and the surface of nanofibers can be observed in FIG. 3e.

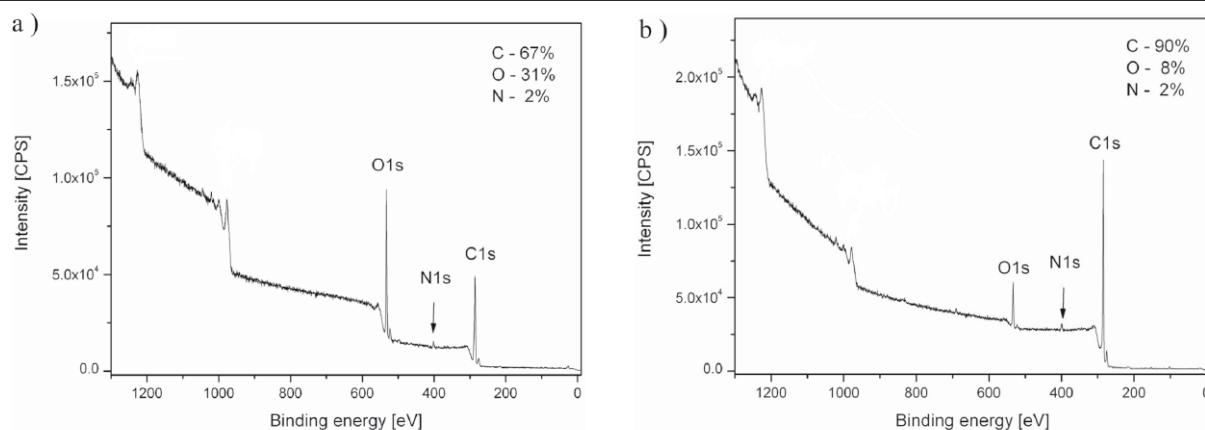




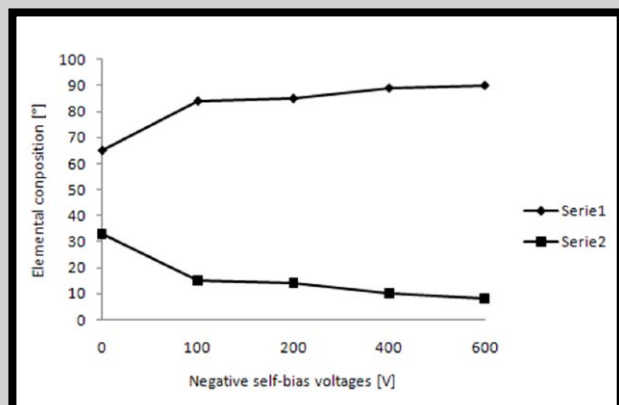
**FIG. 3. SEM images of the chitosan nanofibers: a) non-modified and modified with methane plasma at b) - 100 V, c) - 200 V, d) - 400 V, e) - 600 V.**

XPS survey spectra for non-modified and methane plasma-modified (with the negative self-bias voltage 600 V) chitosan nanofiber mats are shown in FIG. 4. The only elements detected were carbon, oxygen and nitrogen. The 1s (C1s, O1s and N1s) peaks were used for the quantification. The C1s high resolution spectra were acquired to provide more detailed information about the bonding on the nanofiber mats surface. The unmodified chitosan shows elemental composition, which could be expected from the chitosan chemical structure. Slightly higher carbon content can be explained by the small amount of PEO in the nanofiber network or by the carbon contaminants from the ambient atmosphere.

The plasma treatment results in a significant decrease of the oxygen amount. Possibly the OH groups are detached from the polymer chain due to interaction with the plasma active species (this can also be the reason for the higher hydrophobicity of the treated samples) or the  $\text{CH}_x$  thin film can be deposited on the surface (the information depth of XPS is 10 nm at the most). Probably both processes take place. As the negative bias voltage changes to 600 V, the C/O ratio increases.



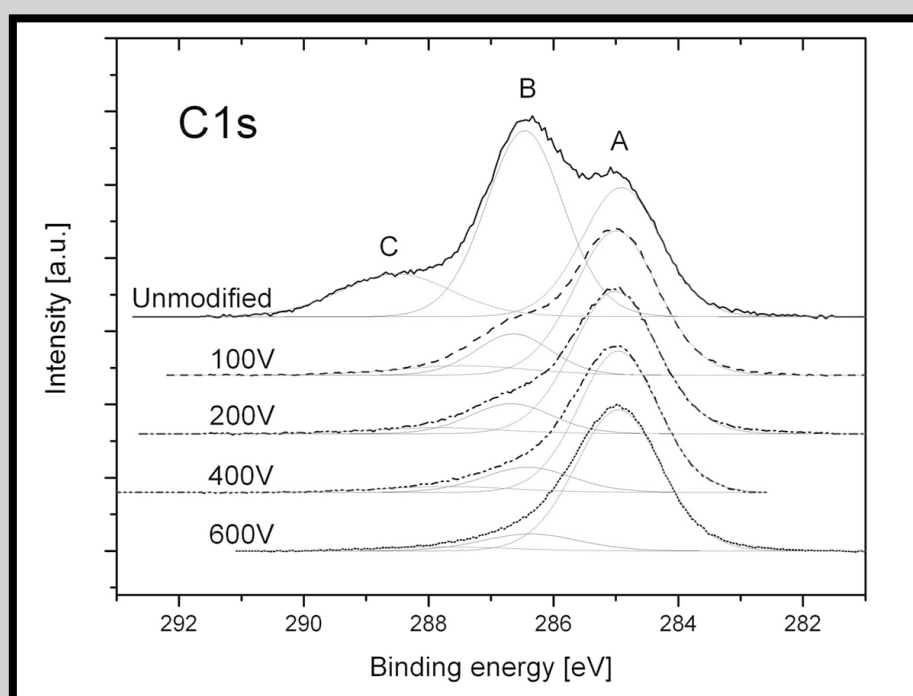
**FIG. 4. XPS survey spectra of chitosan nanofibers: a) unmodified, b) plasma-modified with methane at - 600 V.**



**FIG. 5. XPS elemental composition of plasma-treated chitosan nanofibers surface at different applied negative self-bias voltages.**

The decrease in the oxygen amount can be also related to the disposal of oxygen by atomic hydrogen via chemical reaction [21]. The elemental composition after plasma treatment identified by the XPS spectra is presented in FIG. 5.

The changes in the chitosan structure are also observed in the C1s high resolution spectra (FIG. 6). The untreated chitosan shows three main components. The component A is attributed to C-C or C-H bonds. Based on [22-24] the component B can be related to C-O, C-OH or C-N bonds. This component significantly decreases after plasma treatment and almost disappears for higher negative bias voltages. As it had been already proposed – this is probably related to cleavage of the OH groups from the polymer chain or to covering of the nanofiber surface by the  $\text{CH}_x$  thin film. The last component is usually attributed to carboxylic groups or to O-C-O and O=C-N groups. The O-C-O is the most probable of them as it is present in the chitosan structure; also the O-C-OH should be taken into account (as it is present at the ends of the chitosan polymer chains). This component again disappears with the plasma treatment.



**FIG. 6. XPS high resolution spectra of plasma-treated chitosan nanofibers surface at different applied negative self-bias voltages.**

## Conclusions

In this study electrospun chitosan nanofibers were modified with plasma in the presence of methane gas and the surface characteristics of the modified and unmodified nanofibers were investigated. It was found that the chitosan nanofibers have hydrophobic properties after methane plasma treatment. SEM analyses of the unmodified and plasma-modified chitosan nanofibers indicate that plasma treatment can induce physical changes on the surface of the nanofibers. The changes in the chitosan surface chemistry caused by the plasma treatment are documented by the XPS measurements. The amount of oxygen on the nanofiber surface decreases with the plasma treatment. The oxygen content further drops with increased bias voltage. The high resolution spectra deconvolution also supports the possible explanation of the hydrophobicity changes (less OH group – higher hydrophobicity).

## Acknowledgments

*This work was supported by MSM4674788501 and ME10145 project.*

- [1] Fujihara, K., Kotaki, M., Ramakrishna, S., „Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers”, *Biomaterials*, Vol. 26, No.19., 2005, pp 4139-4147.
- [2] Demir, M.M., Yilgor, I., Yilgor, E., Erman, B., „Electrospinning of polyurethane fibers”, *Polymer*, Vol. 43 No.11., 2002, pp 3303-3309.
- [3] Verdonk, P., Caliope, P.B., Del Moral Hernandez, E., Da Silva, A.N.R., „Plasma etching of electrospun polymeric nanofibres”, *Thin Solid Films*, Vol. 515, No.2., 2006, pp 831-834.
- [4] Kowalczyk, T., Nowicka, A., Elbaum, D., Kowalewski, T.A., „Electrospinning of Bovine Serum Albumin. Optimization and the Use for Production of Biosensors”, *Biomacromolecules*, Vol. 9, No.7., 2008, pp 2087-2090.
- [5] Virji, S., Kaner, R.B., Weiller, B.H., „Hydrogen Sensors Based on Conductivity Changes in Polyaniline Nanofibers”, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 110, No.44., 2006, pp 22266-22270.
- [6] Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., Ramakrishna S., „A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites”, *Composites Science and Technology*, Vol. 63, No.15., 2003, pp 2223-2253.
- [7] Norris, I.D., Shaker, M.M., Ko, F.K., MacDiarmid, A.G., „Electrostatic fabrication of ultrafine conducting fibers: polyaniline/polyethylene oxide blends”, *Synthetic Metals*, Vol. 114, No.2., 2000, pp 109-114.
- [8] Dong, F., Li, Z., Huang, H., Yang, F., Zheng, W., Wang, C., „Fabrication of semiconductor nanostructures on the outer surfaces of polyacrylonitrile nanofibers by in-situ electrospinning”, *Materials Letters*, Vol. 61, No.11-12., 2007, pp 2556-2559.
- [9] Yun, K. M., Jr. Hogan, Ch.J., Matsubayashi, Y., Kawabe, M., Iskandar, F., Okuyama, K., „Nanoparticle filtration by electrospun polymer fibers”, *Chemical Engineering Science*, Vol. 62, No.17., 2007, pp 4751-4759.
- [10] Ma, Z., Kotaki, M., Yong, T., Heb, W., Ramakrishna, S., „Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering”, *Biomaterials*, Vol. 26, No.15., 2005, pp 2527-2536.
- [11] Torres Vargas, E.A., do Vale Baracho, N.C., de Brito, J., de Queiroz, A.A., „Hyperbranched polyglycerol electrospun nanofibers for wound dressing applications”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, No.3., 2010, pp 1069-1078.
- [12] Sill, T.J., von Recum, H.A., „Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering”, *Biomaterials*, Vol. 29, No.13., 2008, pp 1989-2006.
- [13] Jeong, L., Yeo, I.-S., Kim, H.N., Yoon, Y.I., Jang, D.H., Jung, S.Y., Min, B.-M., Park, W.H., „Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 44, No.3., 2009, pp 222-228.
- [14] Jia, J., Duan, Y.-Y., Yu, J., Lu, J.W., „Preparation and immobilization of soluble eggshell membrane protein on the electrospun nanofibers to enhance cell adhesion and growth”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 86A, No.2., pp 364-373.
- [15] Yoon, Y.I., Moon, H.S., Lyoo, W.S., Lee T.S., Park, W.H., „Superhydrophobicity of PHBV fibrous surface with bead-on-string structure”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 320, No.1., 2008, pp 91-95.
- [16] Allcock, H.R., Steely, L.B., Kim, S.H., Kim, J.H., Kang, B.-K., „Plasma Surface Functionalization of Poly[bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphazene] Films and Nanofibers”, *Langmuir*, Vol. 23, No.15., 2007, 8103-8107.
- [17] Sun, T., Feng, L., Gao, X., Jiang, L., „Bioinspired Surfaces with Special Wettability”, *Accounts of Chemical Research*, Vol. 38, No.8., 2005, pp 644-652.
- [18] Kitahara, N., Sato, T., Isogawa, H., Ohgoe, Y., Masuko, S., Shizuku, F., Hirakuri, K.K., „Antibacterial property of DLC film coated on textile material”, *Diamond and Related Materials*, Vol. 19, No.7-9., 2010, 690-694.
- [19] Haider, S., Park, S.Y., Lee, S.H., „Preparation, swelling and electro-mechanochemical behaviours of gelatin-chitosan blend-membrane”, *Soft Matter*, Vol. 4, 2008, 485-492.
- [20] L. Martinová and D. Lubasová, „Electrospun Chitosan based Nanofibers”, *Research Journal of Textile and Apparel*, Vol. 12, No.2, 2008, pp 72-79.
- [21] Ogino, A., Kral, M., Yamashita, M., Nagatsu, M., „Effects of low-temperature surface-wave plasma treatment with various gases on surface modification of chitosan”, *Applied Surface Science*, Vol. 255, No.5., 2008, pp 2347-2352.
- [22] Kang, J., Liu, H., Zheng, Y.-M., Qua, J., Paul Chen, J.P., „Systematic study of synergistic and antagonistic effects on adsorption of tetracycline and copper onto a chitosan”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 344, No.1., 2010, 117-225.
- [23] <http://www.lasurface.com>
- [24] Briggs, D., Grant, J., „Surface Analysis by Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy”, IM Publication, 2003.



# IN VITRO EVALUATION OF POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MEMBRANE

M. KROK<sup>1</sup>, R. HESS<sup>2</sup>, I. WOJAK<sup>1</sup>, D. KOŚCIELNIAK<sup>3</sup>,  
D. SCHARNWEBER<sup>2</sup>, E. PAMUŁA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup> TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN,  
MAX BERGMANN CENTER OF BIOMATERIALS,  
BUDAPESTER STR. 27, 01069 DRESDEN, GERMANY

<sup>3</sup> JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGE OF MEDICINE,  
DEPARTMENT OF PEDODONTICS,  
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKOW, POLAND

\*E-MAIL: EPAMULA@AGH.EDU.PL

## Abstract

*The aim of this study was to prepare and evaluate the properties of a new membrane dedicated for the treatment of bone defects in periodontology according to guided tissue regeneration (GTR) technique. The first part of this study was to prepare the membrane from resorbable poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and verify its microstructure. Biological evaluation was lead using the cells interesting from the point of view of GTR, e.g. human fibroblasts and mesenchymal stem cells (hMSC). It was found that the obtained membrane has asymmetric microstructure and defined pore size. Cell culture experiments show that the membrane is biocompatible with fibroblasts and hMSC. Both types of cell proliferated well on the membrane. hMSC cultured on the membrane exhibited better osteogenic differentiation and higher mineralization as compared to control tissue culture polystyrene.*

[Engineering of Biomaterials, 94, (2010), 7-10]

## Introduction

Guided tissue regeneration (GTR) is new method using a barrier membrane to protect the bone defect from invasion of soft tissue [1]. Mostly used barrier membranes have asymmetric structure and are made from non-degradable or biodegradable polymers. The non-degradable membranes are produced from expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE – Gore-Tex®, USA). The e-PTFE is chemically and biologically stable. This material has good barrier properties and gives good results in tissue regeneration process. However it must be removed by a secondary operation that is necessary to repair dehiscence because of natural unresorbability [2]. The second group contains resorbable polymers of synthetic or natural origin. The major benefit of bioresorbable membranes is absence of necessity of a second surgery to remove the membranes. The most commonly used natural material to produce membranes is collagen (Bio-Gide®, Bicon, BioMend, etc.). Collagen is a natural component of bone matrix and is highly biocompatible. The disadvantage of collagen materials is the possibility of disease and pathogen transfer from animals. Better solution seems to be the use of bioresorbable membranes made from synthetic aliphatic polyesters such as GoreResolut® (Goremedical, USA). All the membranes available on the

market made from collagen or resorbable polyesters have asymmetric, fibrous microstructure. In this type of materials the volume fraction and size of pores are however difficult to be controlled [1-4].

Currently much research is done to work out new materials for GTR technique. Several resorbable polymers such as poly-ε-caprolacton, polylactides, polyglycolide, copolymers of lactide and glycolide and chitosan are applied to produce new generation GTR membranes [5-11]. The materials are designed in such a way to ensure biocompatibility, bioresorbability, optimal surface properties, and microstructure for desired cells to adhere and grow.

The aim of this study was to prepare a new barrier non-fibrous, asymmetric membrane with defined pore size and to evaluate its biological properties in vitro.

## Materials and Methods

### Preparation of the membrane

PLGA with a molar ratio of L-lactide to glycolide of 85:15 and molecular weights  $M_n=100$  kDa,  $M_w=210$  kDa was used to prepare the membrane by phase separation. PLGA was dissolved in dichloromethane (POCh, Gliwice) and 60 wt% of polyethylene glycol (PEG, Aldrich, Germany,  $M_w=400$  Da) was added. Mixture was slip-casted on smooth glass surface and dried in air and in vacuum, followed by leaching out PEG in distilled water. Detailed method of membrane preparation is described in patent application [12].

### Microstructure

The microstructure of the membrane was studied under scanning electron microscope (SEM, Nova NanoSEM 200, FEI, USA) under magnification of 2000x and 3000x. Before the analysis, the samples were sputter-coated with a thin carbon layer to make them conductive. The atomic force microscope (Explorer, Veeco, USA) was also used to study membrane topography and average roughness ( $R_a$ ). For top and bottom surfaces 3 pictures were taken at scan areas of  $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ .

### Biological evaluation

For in vitro studies the membrane was fixed in CellCrown inserts (Scaffdex, Finland), in such a way that top (in contact with air after slip-casting) or bottom surfaces (in contact with glass surface after slip-casting) of the membrane were exposed. The samples were sterilized by oxygen peroxide plasma (Sterrad, ASP, J&J, USA) and the cells of human origin: fibroblasts (from Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ an der Technischen Universität Dresden Medizinische Klinik I) or hMSC (from Clinic for Dermatology, Venerology and Allergology, Universität Leipzig Max-Bürger-Forschungszentrum) were seeded on the membrane's surface at the density of 10000 cells/cm<sup>2</sup>. As control the cells were cultured on tissue culture polystyrene (TCPS, Nunclon, 24-well plates) (FIG. 1). The cells were incubated at 37°C and 7.0% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h in base medium (BM - DMEM, 10% FBS, 1% P/S, 2 mM glutamine), and for 14 and 21 days in two media: BM for fibroblasts and hMSC as well as osteogenic differentiation medium (DM) for hMSC (BM + ascorbic acid 300 mM, β-glycerophosphate 10 mM, dexamethasone 10 nM). Cell proliferation and osteogenic differentiation were studied by lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) activities measurements, respectively. Mineralization of hMSC was analysed by calcium concentration test. The results were expressed as means ± SD. Statistical significance was determined by t-test and the differences were regarded as significant at  $p < 0.05$ .

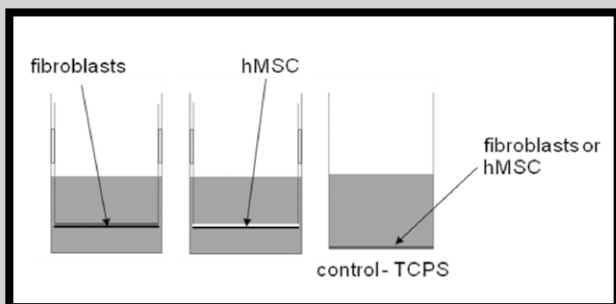


FIG. 1. Scheme of cell culture.

## Results

### Microscopic characterization

Microscopic evaluations showed that the membrane has asymmetric microstructure with pores in the range of 3-6  $\mu\text{m}$ . The bottom side of the membrane is more rough than the top one (FIG. 2). These findings were also confirmed by AFM analysis (FIG. 3), which shows similar surface topography as registered by SEM. Surface roughness analysis shows that the top of the membrane is more smooth with  $R_a = 280 \pm 10$  nm, while the bottom is more textured and porous with  $R_a = 550 \pm 30$  nm.

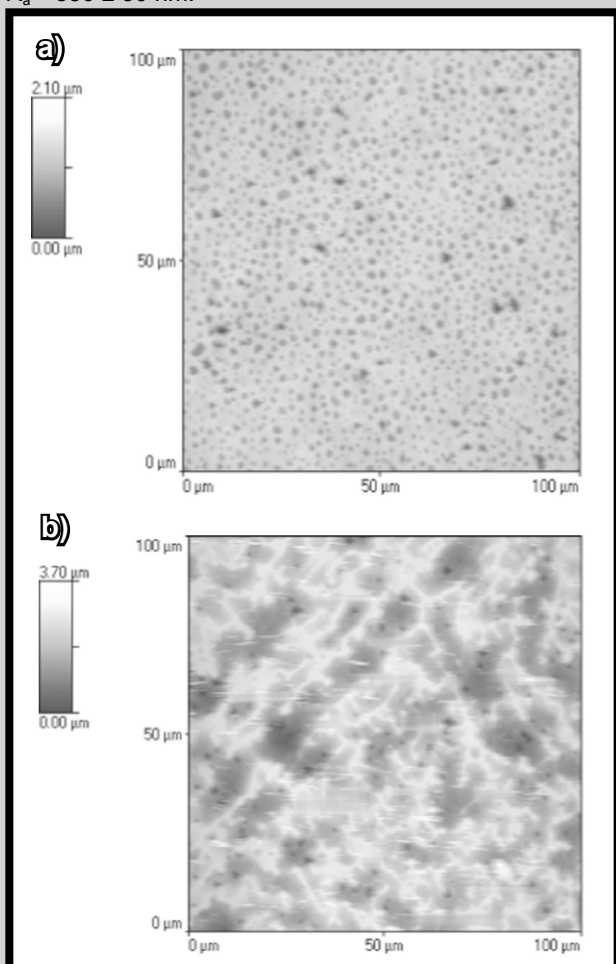


FIG. 3. AFM pictures of PLGA membrane a) top, b) bottom.

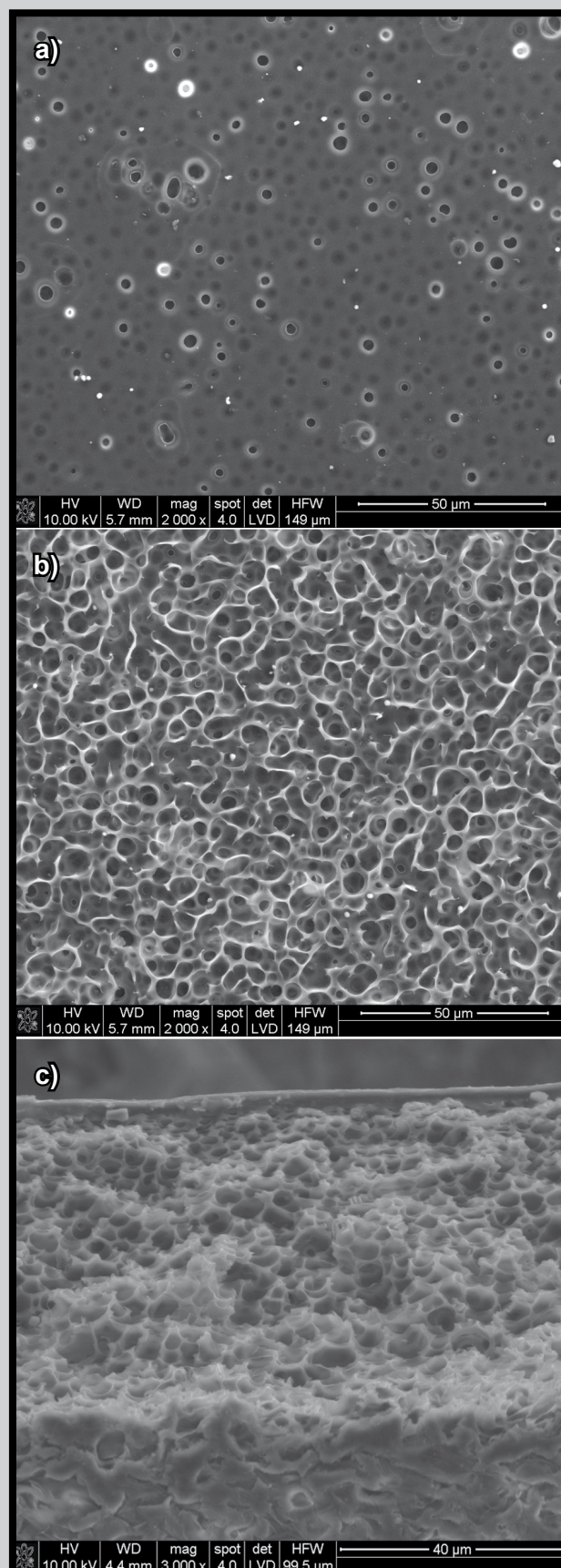
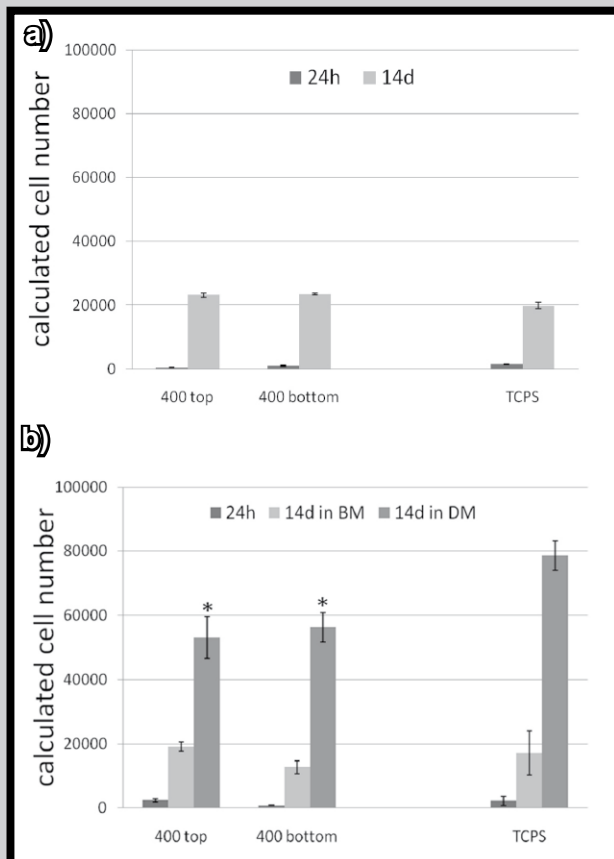


FIG. 2. SEM microphotographs of PLGA membrane a) top, b) bottom, c) cross-section.

### Biological evaluation

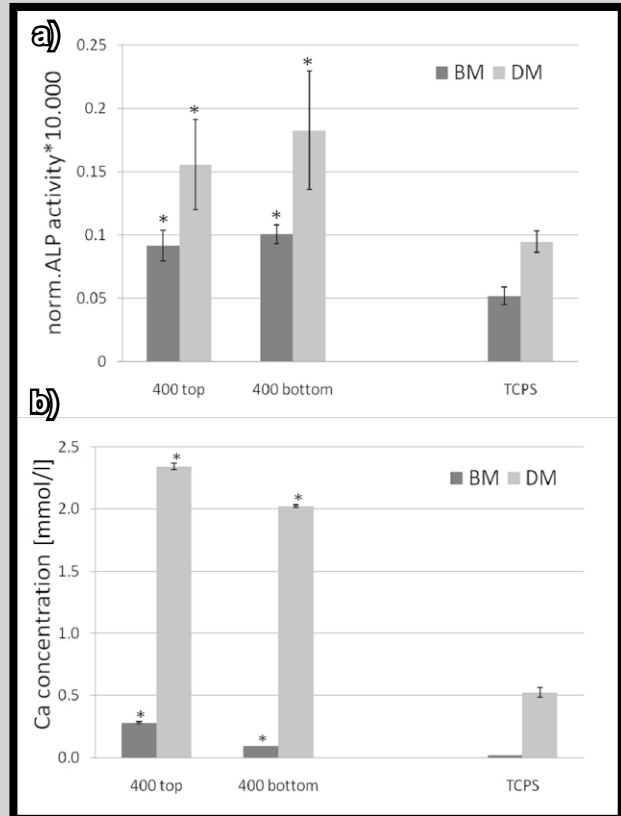
LDH activity results show that fibroblasts and hMSC proliferation after 24 h and 14 days in BM were similar as on control material (FIG. 4a and b). LDH activity of hMSC in DM was higher than in BM, but the cells proliferated better on control TCPS than on tested membrane (FIG. 4b). The results show that fibroblasts proliferation does not depend on the side of the membrane (FIG. 4a), while hMSC proliferation on more smooth top surface tended to be higher (FIG. 4b). Osteogenic differentiation of hMSC measured by ALP activity (FIG. 5a) and their mineralization (FIG. 5b) were higher in DM than in BM. Concomitantly hMSC differentiation and mineralization on the membranes were significantly higher than for cells cultured on control TCPS (FIG. 5a,b). A tendency of higher mineralisation of hMSC on more smooth top surface of the membrane was also observed (FIG. 5b).



**FIG. 4. Proliferation of fibroblasts (a) and hMSC (b) evaluated by LDH activity after 24 h and 14 days in BM and DM. Asterisks indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to control TCPS within one group.**

### Discussion and conclusion

The results show that the elaborated method of preparation enables to obtain porous non-fibrous asymmetric PLGA membrane. The method is based on phase separation between PLGA and PEG dissolved in non-polar solvent. As a result spherical PEG domains 3–6  $\mu\text{m}$  in diameter are created in a PLGA matrix. Differences in density of both compounds cause sedimentation of the component of higher density, thus resulting in asymmetry of the membrane. The membrane microstructure is different from that of typical fibrous non-resorbable and resorbable GTR membranes available on the medical market [2].



**FIG. 5. HMSC differentiation after 14 days in BM and DM (a) and mineralization after 21 days in BM and DM (b). Asterisks indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to TCPS within one group.**

Biological experiments show that the membrane supports growth of fibroblasts and hMSC. Our results may be compared with the results obtained by Alpar et al. who found that collagen BioGide® membranes facilitate bone cells proliferation to the same extent as a control tissue culture polystyrene [4]. On the other hand in the same study it was found that e-PTFE and polylactic acid membranes induced slight to moderate cytotoxic reactions [4], what was not the case in our experiment. The growth of hMSC was better in osteogenic differentiation medium than in base medium, what suggests that supplementary compounds provided to the medium do favour not only cell differentiation, but also cell proliferation. As expected hMSC differentiation and mineralization in differentiation medium were higher than in base medium. Differentiation and mineralisation of hMSC cultured on the membranes were higher than for those cells cultured on control tissue culture polystyrene. It implies that the microstructure and physico-chemical properties of the elaborated material are appropriate for hMSC. Moreover hMSC show the tendency of better proliferation and mineralization on more smooth top surface of the membrane than on more rough bottom surface of the membrane. This finding shows that biological response to the material could be modulated by the microstructural parameters of the membrane.

To sum up, the results show that PLGA membranes presented in this study specifically do support stem cells adhesion, proliferation and osteogenic differentiation. It is of key importance taking into account future application of the membranes in GTR technique in periodontology.



*The authors thank Anja van der Smissen and Dr. Ulf Anderegg (Clinic for Dermatology, Venerology and Allergology, Universität Leipzig Max-Bürger-Forschungszentrum) for providing fibroblasts and Prof. P. Dobrzyński (Center of Polymer and Carbon Materials, PASC, Zabrze, Poland) for providing polymer substrate. This study was financed from the Polish Budget Funds for Scientific Research within the years 2009-2012, as a research project N° N507280736.*

## Piśmiennictwo

- [1] Behring J., Junker R., Walboomers F., Chessnut B., Jansen J.A.: Toward Guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review, *Odontology* 96 (2008), 1-11.
- [2] Zhao S., Pinholt E. M., Madsen J. E., Donath K.: Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats, *J Cranio-Maxillofac Surg* 28 (2000), 116-122.
- [3] Taguchi Y., Amizuka N., Nakadate M., Ohnishi H., Furii N., Oda K., Nomura S., Maeda T.: A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane, *Biomaterials* 26 (2005), 6158-6166.
- [4] Alpar B., Leyhausen G., Günay H., Geurtsen W.: Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells, *Clin Oral Invest* 4 (2000), 219-225.
- [5] Yang F., Both S. K., Yang X., Walboomers X. F., Jansen J. A.: Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application, *Acta Biomaterialia* 5 (2009), 3295-3304.
- [6] Kikuchi M., Koyama Y., Yamada T., Imamura Y., Okada T., Shirahama N., Akita K., Takakuda K., Tanaka J.: Development of guided bone regeneration membrane composed of tricalcium phosphate and poly(L-lactide-co-glicolide-co-e-caprolactone) composites, *Biomaterials* 25 (2004), 5979-5986.

## References

- [7] Stavropoulos A., Sculean A., Karring T.: GTR treatment of intra-bony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss), *Clin Oral Invest* 8 (2004), 226-232.
- [8] Nieminen T., Kallela I., Keränen J., Hiiidenheimo I., Kainulainen H., Wuolijoki E., Rantala I.: In vivo and in vitro degradation of a novel bioactive guided tissue regeneration membrane, *Int J Oral Maxillofac Surg* 35 (2006), 727-732.
- [9] Owen G. Rh., Jackson J., Chehroudi B., Burt H., Brunette D. M.: A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration, *Biomaterials* 26 (2005), 7477-7456.
- [10] Xianmiao C., Yubao L., Yi Z., Li Z., Jidong L., Huanan W.: Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, *Mat Sci Eng C* 29 (2009), 29-35.
- [11] Ho M-H., Hsieh C-C., Hsiao S-W., Thien D. V. H.: Fabrication of asymmetric chitosan GTR membranes for the treatment of periodontal disease, *Carbohydrate Polym* 79 (2010), 955-963.
- [12] P-391519. Method of manufacturing of resorbable membrane for guided tissue regeneration / Sposób wytwarzania resorbowalnej membrany do sterowanej regeneracji tkanek inventors / inventors / wynalazcy: E. Pamuła, S. Błażewicz, M. Krok, D. Kościelniak, P. Dobrzyński. (2010-06-15).

# HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON NANOFIBROUS PLGA MEMBRANES LOADED WITH NANODIAMONDS

MARTIN PARIZEK<sup>1</sup>, TIMOTHY E. L. DOUGLAS<sup>2</sup>,  
ALEXANDER KROMKA<sup>3</sup>, ANDREA RENZING<sup>2</sup>, ESKE VOSS<sup>2</sup>,  
MARIEA A. BRADY<sup>2</sup>, PATRICK H. WARNKE<sup>2</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF GROWTH AND DIFFERENTIATION  
OF CELL POPULATIONS, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
VIDEŇSKÁ 1083, CZ-14220 PRAGUE 4 – KRČ

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY,  
UNIVERSITY OF KIEL,

ARNOLD-HELLER-STRASSE 16, 24105 KIEL, GERMANY

<sup>3</sup> INSTITUTE OF PHYSICS,

ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,

ČUKROVARNICKÁ 10, CZ-16253 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC

\* E-MAIL: LUCY@BIOMED.CAS.CZ

## Abstract

*Using an electrospinning technique, we constructed composite nanofibrous membranes containing a copolymer of L-lactide and glycolide (PLGA, ratio 85:15) and 33 wt% of nanodiamond particles. The number of initially adhering human osteoblast-like MG 63 cells on day 1 after seeding, their spreading and subsequent growth were similar on both types of membranes. However, higher cell numbers on day 3 and 7 after seeding and a larger cell spreading area were found in the cells in the control polystyrene cell culture dishes. Nevertheless, the composite PLGA-ND membranes provided relatively good support for colonization with bone-derived cells; thus this material is promising for bone tissue engineering.*

**Keywords:** nanofibers, nanoparticles, nanotechnology, electrospinning, bone tissue engineering

[*Engineering of Biomaterials*, 94, (2010), 11-13]

## Introduction

Electrospinning is a promising method for creating many types of nanofibers, which can have a broad spectrum of applications, including tissue engineering.

Nanofibers, especially in the form of nanofibrous scaffolds, have become promising cell carriers for advanced tissue replacement. This is mainly due to the fact that these scaffolds closely mimic the structure of the fibrous component of the native extracellular matrix. In comparison with conventionally-used flat or microstructured cell growth supports, nanostructured carriers improve the cell-matrix interaction, e.g. by adsorption of cell adhesion-mediating molecules in an appropriate geometrical (spatial) conformation, which enables good accessibility of specific sites on these molecules to cell adhesion receptors. In addition, nanostructured substrates can be advantageously applied particularly in bone tissue engineering. The reason is that these substrates preferentially adsorb vitronectin, which is recognized mainly by osteoblasts [1,2].

In the present study, we have constructed nanofibrous membranes by electrospinning of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) mixed with nanodiamond (ND) particles as potential growth supports for bone cells. We therefore investigated the adhesion and proliferation of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on these materials. In our earlier studies, PLGA proved to be an appropriate material for constructing porous and fibrous scaffolds for bone tissue engineering [3,4]. In comparison with pure polylactic acid (PLA), the PLGA copolymer is less brittle, and in comparison with pure polyglycolide (PGA), it is more slowly degradable (i.e., less prone to hydrolytic degradation). It thus provides a more stable support for bone tissue regeneration, which is a relatively long-term process in human beings, especially among the aged. The ND particles were added to reinforce the nanofibrous scaffolds and to create an additional nanostructure on the fiber surface in order to enhance the scaffold bioactivity. In our earlier studies, nanocrystalline diamond films provided excellent growth support for bone-derived cells [5,6].

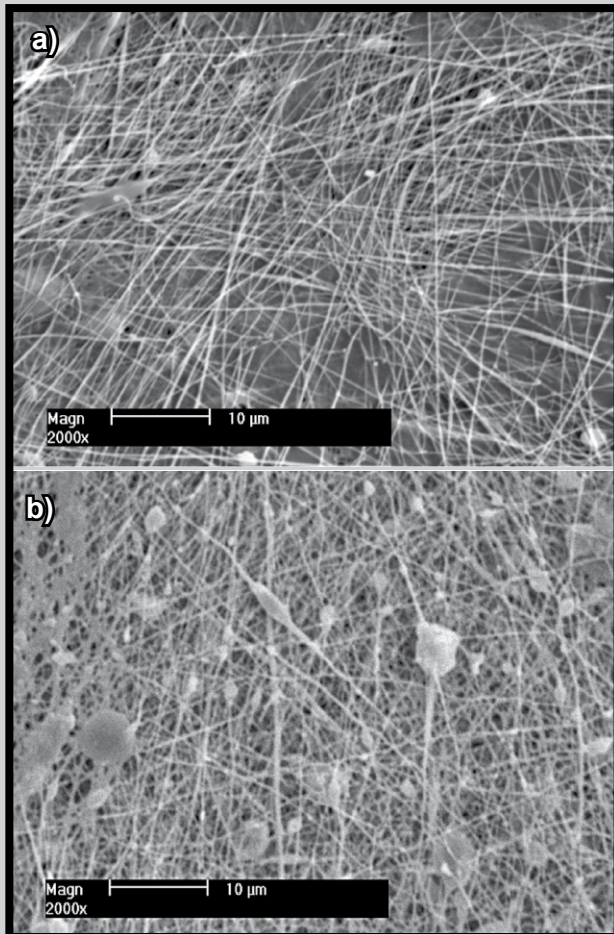
## Materials and Methods

### Preparation of the nanofibrous membranes

The nanofibrous membranes were prepared from a copolymer of L-lactide and glycolide (PLGA, ratio 85:15, PURASORB PLG 8531, Purac Biomaterials, Germany). The copolymer was dissolved in a mixture of methylene chloride (Sigma-Aldrich, Cat. No. D6 510-0) and dimethyl formamide (Sigma-Aldrich, Cat. No. D15 855-0) at a concentration of 2.3 wt%. The ratio of the two solvents was 2:3. The nanofibrous membranes were then prepared by electrospinning in a Nanospider™ machine (Elmarco, Czech Republic), using a vertically positioned spike-like electrode (voltage 24.6 kV, working distance between the electrodes: 145 mm). Some nanofibrous membranes were created in a combination of PLGA with nanodiamond (ND) powder, kindly provided by Prof. Stanislaw Mitura, Technical University of Lodz, Lodz, Poland [7]. In 1 ml of PLGA solution, 0.007 g of the ND powder was added and homogeneously dispersed by sonication (LABSONIC U-2000, B. Braun Biotech, Germany, time of sonication 5s). The concentration of ND in PLGA diluted in methylene chloride and dimethyl formamide was therefore 0.7 wt%, and in the pure PLGA after evaporation of the solvents, this concentration reached almost 33 wt%.

### Cell culture on the nanofibrous membranes

The nanofibrous membranes were cut into square samples 1x1 cm in size, fixed in CellCrown inserts (Scaffdex, Finland), sterilized by gamma irradiation, inserted into polystyrene 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland; well diameter 1.5 cm), rinsed overnight with Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, U.S.A.). The membranes were then seeded with human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) in a density of 17,000 cells/cm<sup>2</sup> and in 1.5 ml of DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco). The cells were cultured for 1, 3, or 7 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> in the air. The polystyrene culture well was used as a reference material. For each experimental group and time interval, five samples were used.



**FIG. 1. Morphology of a pure (a) and nanodiamond-enriched (b) PLGA nanofibrous membrane. Scanning electron microscope XL30CP (Phillips Electron Optics GmbH, Kassel, Germany), objective magnification 2000x, bar = 10  $\mu\text{m}$ .**

#### Evaluation of cell adhesion and growth on the nanofibrous membranes

On days 1, 3 and 7 after seeding, the samples were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS). The cells on one sample per experimental group and time interval were fixed by 70% cold ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) and stained with a combination of Texas Red  $\text{C}_2$ -maleimide fluorescent membrane dye (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008; concentration 20 ng/ml in PBS) and Hoechst # 33342 nuclear dye (Sigma, U.S.A.; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS). The morphology and distribution of the cells on the membrane surface were then evaluated on pictures taken under the Nikon Eclipse Ti-E microscope equipped with a Nikon DS-Qi1 MC digital camera and NIS-Elements AR software, version 3.10.

On day 1 after seeding, the size of the cell spreading area was also measured using Atlas Software (Tescan Ltd., Brno, Czech Republic). For each experimental group, 141 to 349 cells were evaluated.

The four remaining samples were used for evaluating the cell number. The cells were rinsed with PBS, released with trypsin-EDTA solution (Sigma, Cat. No. T4174; incubation 5 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ ) and counted in a Bürker hemocytometer under an Olympus IX 51 microscope.

#### Statistics

The quantitative results were presented as a mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Statistical significance was evaluated using the ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Values of  $p \leq 0.05$  were considered as significant.

## Results and Discussion

#### Morphology of the nanofibrous membranes

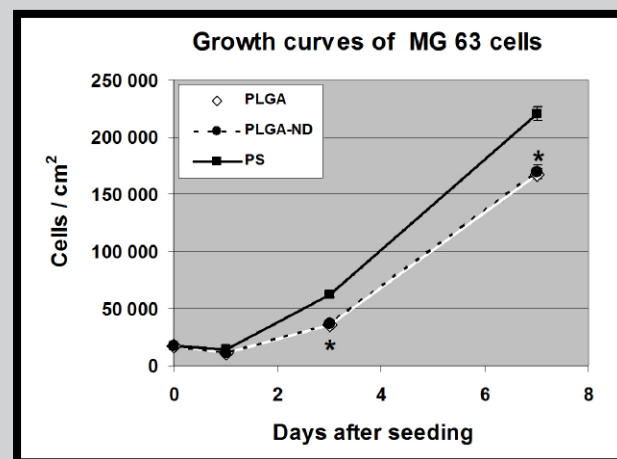
Both pure PLGA and composite PLGA-ND membranes formed a fine cobweb-like layer on the polypropylene fabrics which served as a collector for the nanofibrous membranes. As revealed by scanning electron microscopy, both types of membranes were composed of mostly straight and randomly oriented fibers (FIG. 1). In the PLGA-ND membranes, the fibers were thicker (diameter  $270 \pm 9 \text{ nm}$ ) and the pores among them were smaller (area  $0.46 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ ) than in the pure PLGA membranes (diameter  $218 \pm 4 \text{ nm}$ , area  $1.28 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ ).

#### Cell adhesion and growth on nanofibrous membranes

The adhesion and subsequent growth of MG 63 cells was similar on both pure and ND-loaded PLGA membranes. On the first day after seeding, the number of initially adhering cells on the pure PLGA membrane was  $11,300 \pm 1,200 \text{ cells}/\text{cm}^2$ , and on the PLGA-ND membranes it was  $10,951 \pm 1,027 \text{ cells}/\text{cm}^2$ . The highest average number of initially adhered cells was observed on the control polystyrene dishes ( $14,000 \pm 1,038 \text{ cells}/\text{cm}^2$ ). However, as revealed by ANOVA, this value was not statistically different from the values obtained on the two nanofibrous membranes (FIG. 2).

Also on the third day of the experiment, the cell numbers on both pure and ND-loaded PLGA membranes were similar ( $36,100 \pm 2,200 \text{ cells}/\text{cm}^2$  and  $37,000 \pm 2,500 \text{ cells}/\text{cm}^2$ , respectively). However, on control polystyrene dishes, the cell number was significantly higher, reaching  $61,900 \pm 2,100 \text{ cells}/\text{cm}^2$ . This trend continued towards the 7<sup>th</sup> day after seeding, when the cells on both pure and ND-loaded PLGA membranes again reached similar values ( $167,700 \pm 4,500 \text{ cells}/\text{cm}^2$  and  $169,900 \pm 6,100 \text{ cells}/\text{cm}^2$ , respectively).

The cell spreading area, measured on day 1 after seeding, was on an average larger in the cells on PLGA-ND membranes ( $477 \pm 16 \mu\text{m}^2$ ) than in the cells on pure PLGA membranes ( $442 \pm 15 \mu\text{m}^2$ ), but this difference was not statistically significant. However, both these areas were significantly smaller than those of the cells on the bottom of control polystyrene wells ( $1,057 \pm 33 \mu\text{m}^2$ ). This may be due to the relatively thin diameter of both PLGA and PLGA-ND



**FIG. 2. Growth dynamics of human osteoblast-like MG 63 cells on pure PLGA nanofibrous membranes (PLGA), composite PLGA-nanodiamond membranes (PLGA-ND) and control cell culture polystyrene dishes (PS) from day 1 to 7 after seeding. Mean  $\pm$  S.E.M. from 72 measurements taken from 4 samples for each time interval. ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. Statistical significance: \*  $p \leq 0.05$  in comparison with PS.**



fibers (on an average 218 and 270 nm, respectively), and also their random orientation. In a study performed on NIH 3T3 fibroblasts in cultures on PLGA meshes [8], the cell spreading areas on meshes with fiber diameters of 140 nm and 760 nm were significantly smaller than on continuous PLGA films, and were equal to the value on these films only at a fiber diameter of 3,600 nm. Increasing fiber orientation (from random to parallel) also contributed to enlarging the cell spreading area [8].

Nevertheless, the cells on the PLGA-ND membranes were similar in shape to the cells on the pure PLGA membranes and on the polystyrene dishes, i.e. polygonal or spindle-like, and were distributed homogeneously on the samples. Their number rose continuously with the time of the experiment, and at the end of the experiment these cells were able to create a confluent layer (FIG. 3). These results suggest that the cells on the PLGA nanodiamond membranes behaved physiologically without noticeable signs of cell damage.

## Conclusion

Using an electrospinning technique, we constructed fibrous membranes (average fiber diameter 218-270 nm) made of pure PLGA and PLGA with 33 wt% of nanodiamond. Both pure PLGA and composite PLGA-nanodiamond membranes enabled attachment, spreading and subsequent proliferation of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on these materials, and this cell behavior was similar on both types of membranes. Therefore, our composite PLGA-nanodiamond scaffolds are promising materials for bone tissue engineering.

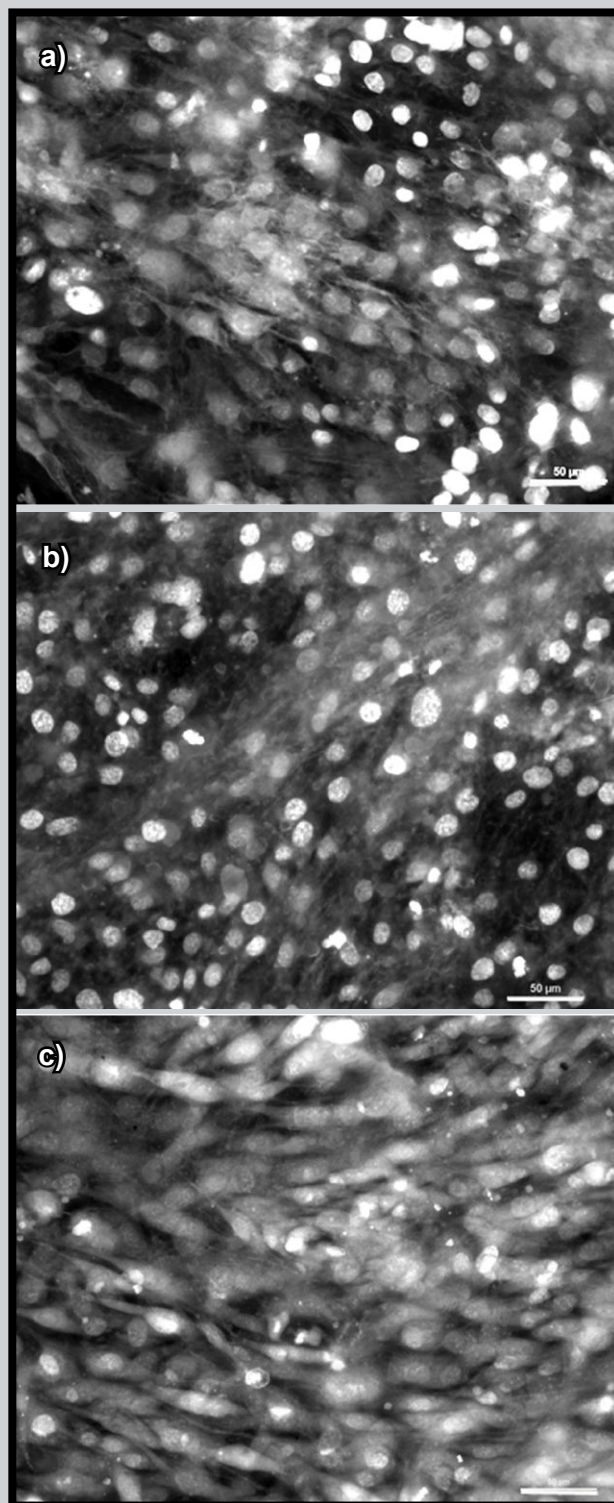
## Acknowledgements

*This study was supported by the Acad. Sci. CR (Grants No. KAN 400480701 and IAAX00100902). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.*

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R: Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 51: 475-483, 2000.
- [2] Price RL, Waid MC, Haberstroh KM, Webster TJ: Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials* 24:1877-1887, 2003.
- [3] Pamula E, Bacakova L, Filova E, Buczynska J, Dobrzynski P, Noskova L, Grausova L: The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 19: 425-435, 2008.
- [4] Pamula E, Filová E, Bacáková L, Lisá V, Adamczyk D: Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J Biomed Mater Res A* 89: 432-443, 2009.
- [5] Grausova L, Bacakova L, Kromka A, Potocky S, Vanecek M, Nesladek M, Lisa V: Nanodiamond as a promising material for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol* 9: 3524-3534, 2009.
- [6] Kromka A, Grausova L, Bacakova L, Vacik J, Rezek B, Vanecek M, Williams OA, Haenen K: Semiconducting to metallic-like boron doping of nanocrystalline diamond films and its effect on osteoblastic cells. *Diamond Relat Mater* 19: 190-195, 2010.
- [7] Mitura S, Mitura K, Niedzielski P, Louda P, Danilenko V: Nanocrystalline diamond, its synthesis, properties and applications. *J AMME* 16: 9-16, 2006.
- [8] Bashur CA, Dahlgren LA, Goldstein AS: Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials* 27: 5681-5688, 2006.



**FIG. 3. Morphology of human osteoblast-like MG 63 cells on day 7 after seeding on a pure PLGA membrane (a), composite PLGA-nanodiamond membrane (b) and polystyrene culture well (c). Cell membrane and cytoplasm were stained with Texas Red C<sub>2</sub>-Maleimide, and the cell nuclei with Hoechst #33342. Nikon Eclipse Ti-E microscope, obj. 20x1.5; Nikon DS-Qi1 MC digital camera, NIS-Elements AR software, version 3.10. Summarization of Z-sections with deconvolution, bar = 50 µm.**

# PRZEDKLINICZNE TESTY ENDOPROTEZ STAWU BIODROWEGO Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH

ANNA MARIA RYNIEWICZ<sup>1,2\*</sup>, TOMASZ MADEJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA KONSTRUKCJI I EKSPLOATACJI MASZYN,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MECHANICZNEJ I ROBOTYKI,  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE

<sup>2</sup> KATEDRA PROTETYKI STOMATOLOGICZNEJ,  
WYDZIAŁ LEKARSKI,  
UNIwersytet Jagielloński Collegium Medicum

\* E-MAIL: ANNA@RYNIEWICZ.PL

## Streszczenie

*W opracowaniu przedstawiono metodę wykonania testów przedklinicznych w aplikacjach endoprotezy stawu biodrowego w układzie anatomicznym. Metoda polegała na modelowaniu różnych konstrukcji endoprotez wykonanych z różnych biomateriałów i wirtualnym osadzeniu, w odwzorowanych na podstawie tomografii komputerowej (CT), strukturach kostnych. Wykorzystanie metody elementów skończonych pozwoliło na przeprowadzenie analiz numerycznych w zamodelowanych obiektach badań. W warunkach przenoszenia obciążeń lokomocyjnych dokonywana była wizualizacja rozkładów naprężeń, przemieszczeń i odkształceń w endoprotezie, kości miednicznej oraz w bliższym końcu kości udowej. Wyniki badań pozwoliły porównać rozwiązania konstrukcyjne endoprotez stawu biodrowego oraz ocenić charakter oddziaływania sztucznego stawu na otaczające tkanki kostne w warunkach indywidualnego pacjenta.*

**Słowa kluczowe:** biomateriały, endoprotezy, tomografia komputerowa, staw biodrowy, modelowanie, analiza

[Inżynieria Biomateriałów, 94, (2010), 14-23]

## Wprowadzenie

Zabieg alloplastyki stawu biodrowego, poprzez wprowadzenie określonej zamiennnej głowy i trzpienia oraz panewki, zmienia całkowicie warunki współpracy charakterystyczne dla biologicznej, prawidłowej pary [1]. Występuje upośledzenie biosmarowania, zaburzenie relacji naprężeń i przemieszczeń w biołożysku wynikające z odmiennego oddziaływania elementów endoprotezy na otaczające tkanki oraz zachodzą procesy zużycia materiałów stosowanych na elementy ruchowe [2].

Na obecnym poziomie rozwoju endoprotezoplastyki, przy olbrzymiej ilości rozwiązań konstrukcyjno-materiałowych endoprotez można postawić pytanie, które rozwiązanie w warunkach indywidualnego pacjenta jest optymalne.

## Materiały i metody

Celem pracy była ocena stosowanych rozwiązań endoprotez stawu biodrowego w aspekcie przeniesienia obciążeń przez konstrukcję biołożyska oraz otaczające struktury kostne po zabiegu całkowitej alloplastyki.

# PRECLINICAL TESTS OF ENDOPROSTHESES OF HIP JOINT USING FINITE ELEMENT METHODS

ANNA MARIA RYNIEWICZ<sup>1,2\*</sup>, TOMASZ MADEJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF MACHINE DESIGN AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING AND ROBOTICS,  
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF STOMATOLOGICAL PROSTHETICS,  
FACULTY OF MEDICINE, COLLEGIUM MEDICUM,  
JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: ANNA@RYNIEWICZ.PL

## Abstract

*The method of preclinical tests in application of endoprostheses of hip joint in the anatomical system is presented in this elaboration. The method is based on the modeling of different constructions of endoprostheses made from different biomaterials. The endoprostheses were virtually placed in natural bone structures and obtained from the computer tomography diagnostic (CT). The use of the finite element method allowed to carry on numerical analyses in modeled objects of tests.*

*The visualization of distribution of stresses, displacements and deformations in endoprostheses, pelvis bone and femoral bone was conducted in the conditions of transfer of load. The results of tests let to compare the construction solutions of endoprostheses of hip joint and estimate the interaction of artificial hip joint on the surrounding bone tissues in individual patient conditions.*

**Keywords:** biomaterials, endoprosthesis, computer tomography, hip joint, modeling, analysis

[Engineering of Biomaterials, 94, (2010), 14-23]

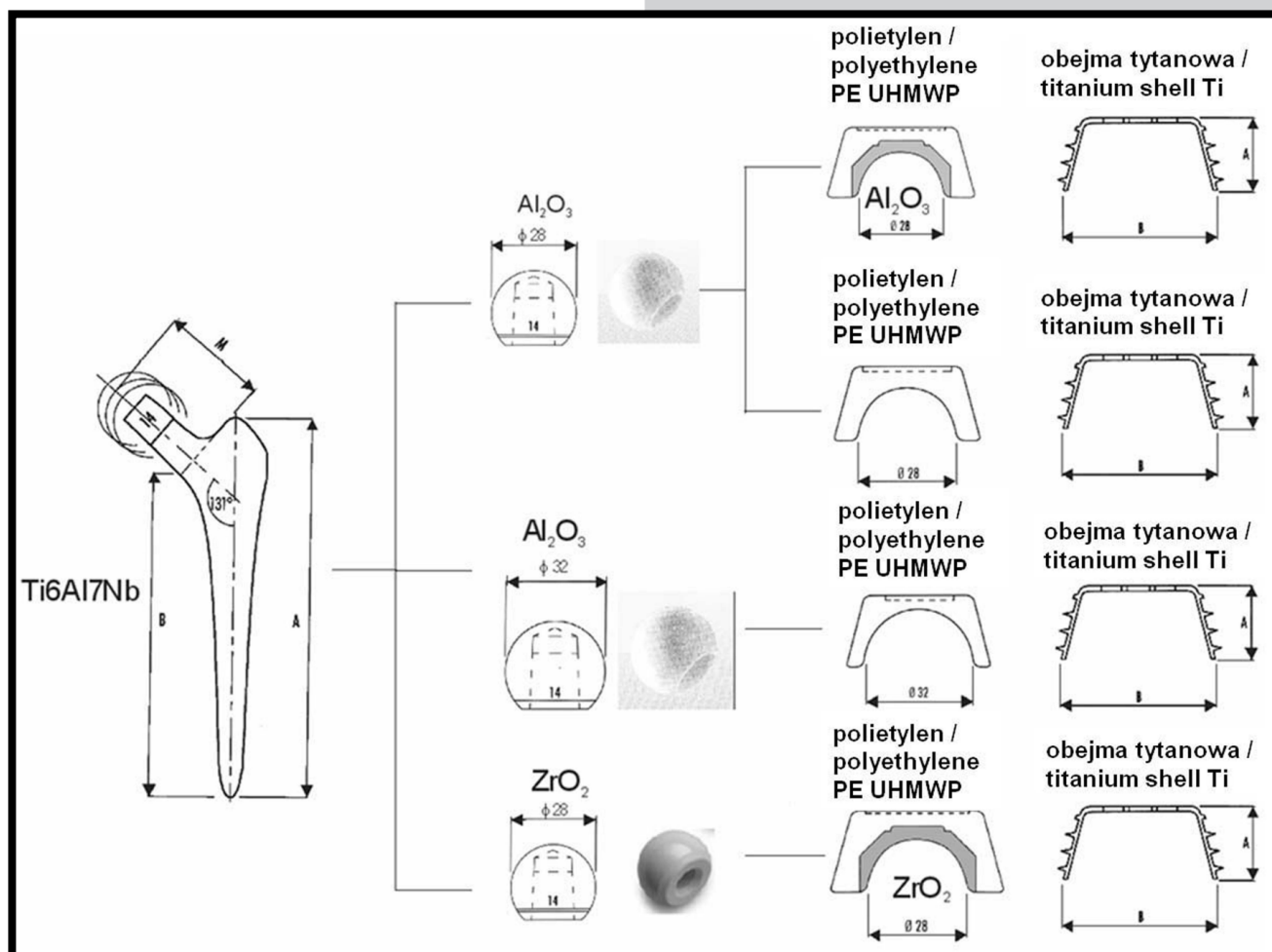
## Introduction

In the alloplastic operation of hip joint, the introduction of specific interchangeable head, stem and cup completely changes the conditions of co-operation characteristic to the proper biological pair [1]. There occur the handicap of biolubrication, disorder of stresses and displacements relation in biobearing which result from different interaction of elements of endoprostheses on the surrounding tissues. What is more, there happen wear processes of materials used on motive elements [2].

On the present level of evolution of endoprothesoplasty, with an enormous amount of constructional and material solutions of endoprostheses, it is possible to ask which solutions in the individual patient conditions are optimal.

## Materials and methods

The aim of study was to estimate applied solutions of endoprostheses of hip joint in the aspect of transfer of loads by the construction of biobearing and the surrounding bone structures after total alloplasty.



**RYS. 1. Zestawienie konfiguracji endoprotez wytypowanych do badań.**

**FIG. 1. The compilation of configurations of endoprostheses selected to tests.**

Analiza rozprzestrzeniania się naprężeń i przemieszczeń w strefie kontaktu głowy i panewki, w konstrukcji sztucznego łożyska oraz strukturach bliższego końca kości udowej i części panewkowej kości miednicznej, może wskazywać na przyczyny obłuzowań [3] wynikające z parametrów konstrukcyjno-materiałowych endoprotezy.

Materiałem do analizy były wybrane endoprotezy stawu biodrowego (RYS. 1) o następujących konfiguracjach materiałowych:

- trzpień wykonany ze stopu tytanowego,
- głowy z ceramiki korundowej lub cyrkonowej,
- panewki dwuwarstwowe: polietylen wysokocząsteczkowy - tytan,
- panewki trójwarstwowe:
  - ceramika korundowa - polietylen wysokocząsteczkowy - tytan,
  - ceramika cyrkonowa - polietylen wysokocząsteczkowy - tytan.

Metoda modelowania i symulacji obejmowała [4]:

- modelowanie 3D geometrii endoprotez o różnych rozwiązaniach konstrukcyjnych,
- odwzorowanie wirtualne (RYS. 2) przestrzennego anatomicznego układu kostno-stawowego pacjenta: lędźwiowy odcinek kręgosłupa, obręcz miednicy, stawy biodrowe oraz bliższe części kości udowych – na podstawie diagnostyki tomograficznej (CT) i programów do analizy i rekonstrukcji obrazów,
- wirtualne osadzenie endoprotezy w strukturach kostnych pacjenta, pozycjonowanej zgodnie z warunkami anatomicznymi,
- wykorzystanie metody elementów skończonych do analizy biomechanicznej bryłowego modelu badawczego (RYS. 3).

The analysis of propagation of stresses and displacements in the contact zone of head and cup, in the artificial biobearing construction and in the structures of proximal apex of femoral bone and acetabulum part of pelvis bone may point to the reasons of loosening [3] that result from construction and material parameters of endoprosthesis.

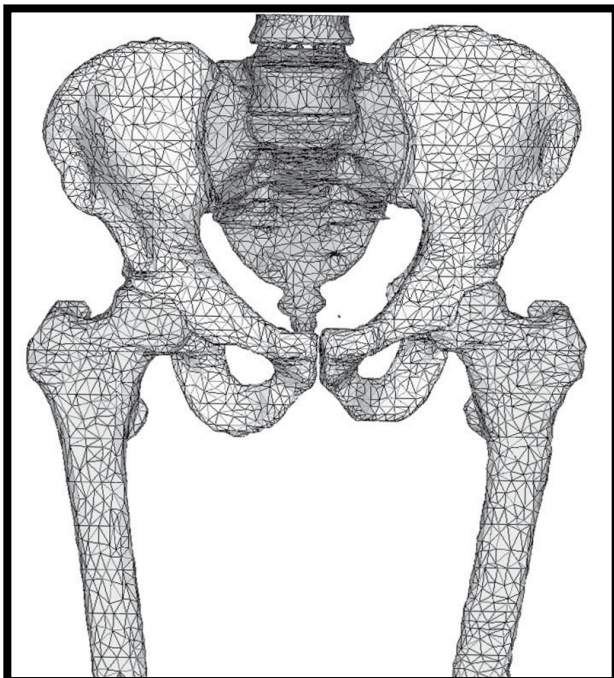
As the materials to the analysis, the previously selected endoprostheses of hip joint (FIG. 1) of the following material configuration were used:

- stems made from titanium alloy,
- heads made from corundum or zirconium ceramics,
- two-layer cups: high-molecular polyethylene - titanium,
- three-layer cups:
  - corundum ceramics - high-molecular polyethylene - titanium,
  - zirconium ceramics - high-molecular polyethylene - titanium.

The method of modeling and simulation included [4]:

- 3D modeling of geometry of endoprostheses of different construction solutions,
- the virtual reconstruction (FIG. 2) of three-dimensional anatomical osteoarticular system of a patient: lumbar segment of spine column, pelvis girdle, hip joints and proximal parts of femoral bones – on the basis of computer tomography and programs to the analysis and reconstructions of images,
- the virtual fixing of endoprosthesis in accordance with anatomical conditions in the bone structures of a patient,
- the use of finite element method to the biomechanical analysis of the solid model of research (FIG. 3).



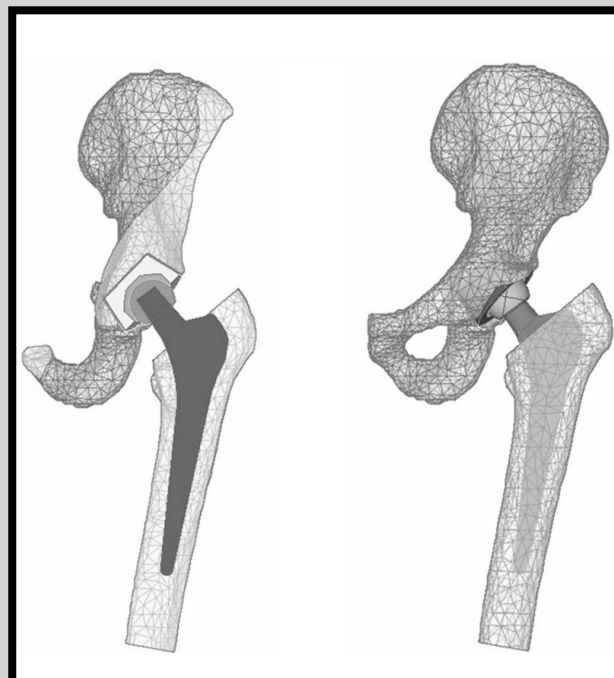


**RYS. 2. Przestrzenny model rzeczywistych struktur kostnych indywidualnego pacjenta (m. l. 56) uzyskany na podstawie diagnostyki CT i rekonstrukcji.**  
**FIG. 2. The virtual model of real bone structures of an individual patient (m. age 56) received on the basis of computer tomography and 3D reconstruction.**

W analizie uwzględniono parametry wytrzymałościowe rozważanych struktur (TABELA 1).

Warunki brzegowe dla różnych wariantów endoprotez ustalono w następujący sposób:

- na strukturę kostną kości miednicznej zadano utwierdzenia: w spojeniu łonowym oraz w stawie krzyżowo-biodrowym (RYS. 4), odbierając węzłom wszystkie stopnie swobody i określając jej położenie przez usytuowanie obręczy miednicy,



**RYS. 3. Zamodelowana endoproteza stawu biodrowego osadzona wirtualnie w tkance kostnej końca bliższego kości udowej i w kości miednicznej.**  
**FIG. 3. The modeled endoprosthesis of hip joint virtually fixed in the bone structure of proximal apex of femoral bone and in pelvis bone.**

In the analysis, the strength parameters of consideration structures were included (TABLE 1).

The marginal conditions for different variants of endoprostheses were established in the following methods:

- On the bone structure of pelvis bone constraint was put: in the pubic symphysis and in the sacroiliac joint (FIG. 4), the nodes had all degrees of freedom taken away and the position was determined by locating pelvis girdle,

**TABELA 1. Wytrzymałościowe parametry materiałowe [1,4,7,9].**  
**TABLE 1. Resistance parameters of materials [1,4,7,9].**

Material / Material	Parametry materiałowe / Material parameters	Moduł Young'a / Modulus of elasticity E [GPa]	Współczynnik Poissona / Poisson's ratio
Kość korowa / Cortical bone		5 – 22*	0.2 – 0.4*
Kość gąbczasta / Spongy bone		0.1 – 5**	0.2 – 0.46**
Polietylen wysokocząsteczkowy / High-molecular polyethylene Sulene®-PE, ISO 5834-1/2 ASTM F 648		1.2	0.4
Tytan / Titanium Protasul®-Ti, ISO 5832-2		110	0.3
Stop tytanowy / Titanium alloy Ti6Al7Nb Protasul® 100, ISO 5832-11 ASTM F 1295		115	0.3
Ceramika korundowa / Corundum ceramics Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> BioloX A <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Keramik, ISO 6474		410	0.21 – 0.27
Ceramika cyrkowa / Zirconium ceramics ZrO <sub>2</sub> /Y-TZP		180	0.3

\* - w obliczeniach numerycznych przyjęto dla kości korowej E = 16,8 GPa, ν = 0,29

\* - in numerical solutions for cortical bone, the following factors were received: E = 16.8 GPa, ν = 0.29

\*\* - w obliczeniach numerycznych przyjęto dla kości gąbczastej E = 3,1 GPa, ν = 0,46

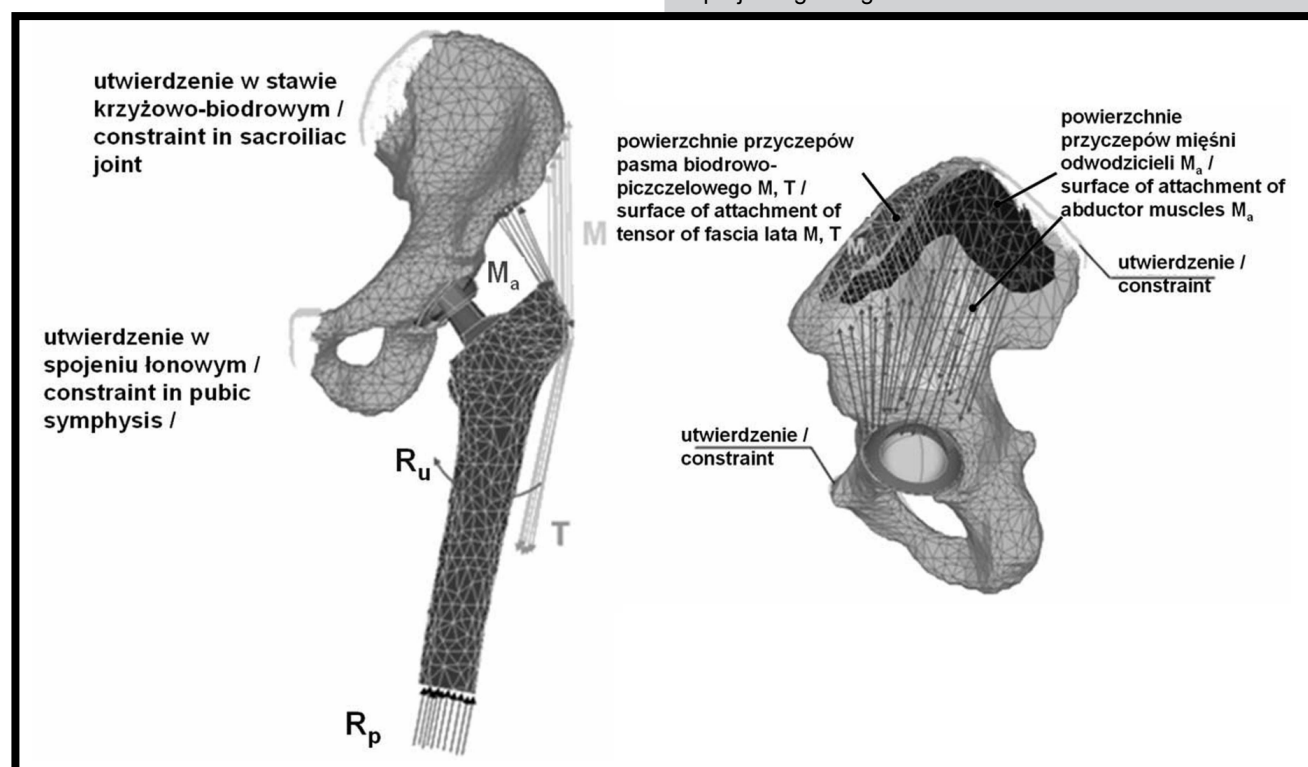
\*\* - in numerical solutions for spongy bone, the following factors were received: E = 3.1 GPa, ν = 0.46

- na strefę implantacji sztucznego stawu biodrowego zadano przestrzennie złożone, quasi-statyczne obciążenie [5,6,7] (RYS. 4) w warunkach stania obunożnego. Uwzględniono ciężar ciała  $P$ , reakcję podłoża  $R_p$ , oddziaływanie mięśni odwodźcicieli  $M_a$ , oddziaływanie pasma biodrowo-piszczelowego  $M, T$  oraz moment rotujący kość udową  $R_u$ .
- w strefie tribologicznej współpracy panewki i głowy zamodelowano kontakt z możliwością ruchu głowy względem panewki. Współczynniki tarcia [3,8]:  $Al_2O_3 - PE$ ,  $Al_2O_3 - Al_2O_3$ ,  $ZrO_2 - ZrO_2$ , wyznaczono w badaniach testowych [7,9] i przyjęto następująco: dla pary  $Al_2O_3 - PE$  współczynnik tarcia statycznego  $\mu_{s1} = 0,3$  i kinematycznego  $\mu_1 = 0,05$ , dla pary  $Al_2O_3 - Al_2O_3$ :  $\mu_{s2} = 0,1$  i  $\mu_2 = 0,01$ , a dla pary  $ZrO_2 - ZrO_2$ ,  $\mu_{s3} = 0,01$  i  $\mu_3 = 0,009$  [10],
- założono izotropowe właściwości tkanki kostnej budującej kość udową i kość miedniczną.

Wykorzystanie programów do analizy i rekonstrukcji przestrzennej obrazu, programów do geometrii bryłowej oraz liczących MES w warunkach implantacji endoprotez stanowi bardzo wygodne narzędzie optymalnego doboru, ponieważ w trakcie realizacji wirtualnych procedur aplikacji endoprotezy zostaje zachowany układ geometryczny struktur anatomicznych pacjenta, a zatem jest możliwość pozycjonowania implantu w obiektywnej przestrzeni geometrycznej. Można również prowadzić wirtualną separację struktur anatomicznych, rozsunąć je do aplikacji, a następnie powrót do układu oddających rzeczywiste relacje geometryczne.

- On the implantation zone of artificial hip joint, spatially composed, quasi-static load was put [5,6,7] (FIG. 4) in the conditions of standing on two legs. The following factors were included: the weight of body  $P$ , reaction of basis  $R_p$ , influence of the abductor muscles  $M_a$ , influence of tensor fascia lata  $M, T$  and rotating femoral bone muscle  $R_u$ .
- In the tribological zone of cooperation of cup and head, the contact with the possibility of movement of head towards cup was modeled. The coefficients of friction [3,8]:  $Al_2O_3 - PE$ ,  $Al_2O_3 - Al_2O_3$ ,  $ZrO_2 - ZrO_2$  were determined in tests [7,9] and there the factors were taken into consideration: for pair  $Al_2O_3 - PE$  coefficient of static friction  $\mu_{s1} = 0,3$  and coefficient of cinematic friction  $\mu_1 = 0,05$ , for pair  $Al_2O_3 - Al_2O_3$ :  $\mu_{s2} = 0,1$  and  $\mu_2 = 0,01$  and for pair  $ZrO_2 - ZrO_2$ ,  $\mu_{s3} = 0,01$  and  $\mu_3 = 0,009$  [10],
- The isotropic properties of bone tissue for femoral bone and pelvis bone were established.

The use of the programs for the analysis and reconstructions of images, programs for solid geometry and calculating programs FEM in the condition of implantation of endoprostheses comprise a very comfortable tool of optimal selection, as during the realization of virtual procedures of application of endoprosthesis, the geometric system of anatomical structures of a patient remains preserved. So, there is a possibility of positioning of the implant in objective geometric area. It is also possible to conduct the virtual separation of anatomical structures, push the model away to the application and then have the return to the system projecting real geometric relations.



RYS. 4. Warunki obciążeń i utwierdzeń modeli numerycznych.  
FIG. 4. The condition of loads and constraints of numerical models.

## Wyniki i dyskusja

Po dokonaniu dyskretyzacji obiektów, narzuceniu warunków brzegowych, zadano zmieniające się statycznie obciążenia. Wyznaczono rozkłady naprężeń zredukowanych wg hipotezy Hubera-Misesa-Hencky'ego (HMH) i przemieszczeń wypadkowych dla rozpatrywanych struktur.

## Results and Discussions

Having done the digitalizing of objects and the imposition of the boundary conditions, the static variable loads were put. Distribution both of reduced stresses according to Huber-Misses-Hencky hypothesis (HMH) and of resultant displacements for testing structures were determined.

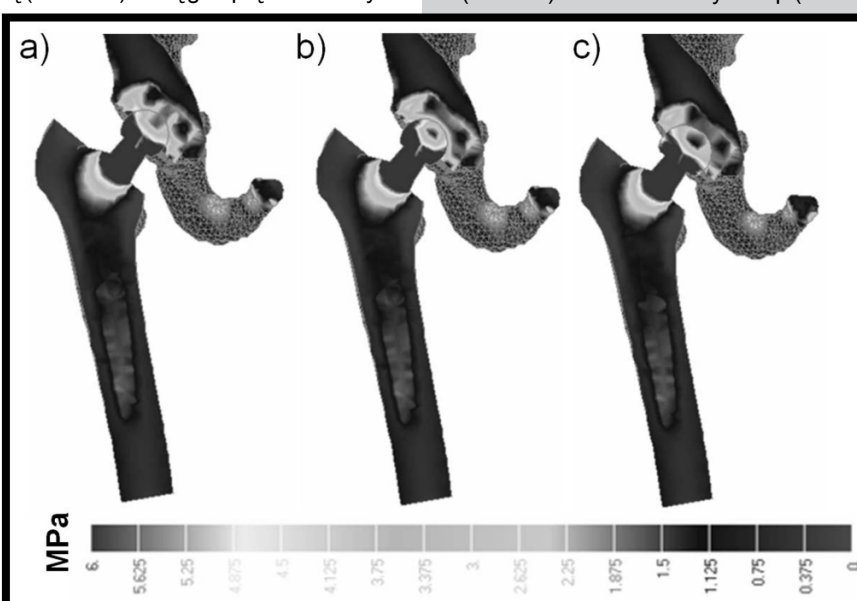
Na RYS. 5 przedstawiono rozkłady naprężeń zredukowanych dla endoprotez bezcementowych w różnych kombinacjach materiałowych i geometrycznych panewek. We wszystkich trzech rozpatrywanych przypadkach (RYS. 5) wystąpiła lokalizacja naprężeń maksymalnych o wartościach 8 MPa w strefie głowy, szyjki i górnej części trzpienia. Naprężenia w dalszej objętości trzpienia tych endoprotez miały podobne rozkłady i wartości. W końcowej części trzpienia naprężenia o wartościach 1,8 MPa, a w części środkowej naprężenia o wartościach 1,2 MPa. W bezpośrednim kontakcie tytanowych trzpieni z kością udową, we wszystkich trzech przypadkach, występowały naprężenia o wartościach 1,2-1,8 MPa. Była to sytuacja korzystna, gdyż takie wartości naprężeń nie powodowały zjawiska stress shielding, a sprzyjały osteointegracji. W przypadku endoprotezy z trójwarstwową panewką (RYS. 5a) zasięg naprężeń maksymalnych w głowie był

mniejszy niż w endoprotezie z panewką dwuwarstwową (RYS. 5b). W trójwarstwowej panewce (RYS. 5a, 6a) stwierdzono strefę koncentracji naprężeń maksymalnych w warstwie korundowej. Naprężenia w kolejnej, polietylenowej warstwie posiadały znacznie mniejsze wartości niż w przypadku panewki dwuwarstwowej (RYS. 5b, 6b). W kości miedniczej następował dalszy spadek naprężeń do wartości 3 MPa. Należy podkreślić, że korund, w zakresie parametrów wytrzymałościowych i tribologicznych, jest materiałem o nieporównywalnie większej odporności niż polietylen wysokocząsteczkowy. Większe wartości nacisków w skojarzeniu korund-korund będą miały

mniej destrukcyjne działanie na konstrukcję endoprotezy niż mniejsze wartości nacisków w skojarzeniu korund-polietylen. W endoprotezach (Ø28 mm i Ø32 mm) z panewkami właściwymi z polietylenu (RYS. 5b,c) stwierdzono charakterystyczne strefy koncentracji naprężeń maksymalnych w obszarze górnej i dolnej części panewki (w dachu i dole panewki). Ponadto na RYS. 5b,c widoczne były charakterystyczne dla endoprotez z panewkami właściwymi z polietylenu obszary koncentracji naprężeń maksymalnych obejmujące warstwę polietylenu i obejmującą tytanową. W przypadku głowy Ø32 mm (RYS. 5c, 6c) skojarzonej z panewką właściwą z polietylenu zasięg i wartości naprężeń w panewce były mniejsze niż dla głowy Ø28 mm (RYS. 5b, 6b). Taka sytuacja wynikała ze wzrostu powierzchni kontaktu głowa-panewka. Na RYS. 5 dla wszystkich rozpatrywanych przypadków występowały strefy spiętrzenia naprężeń maksymalnych na brzegu łoża kostnego – w rejonie, gdzie ze względu na warunki anatomiczne nie nastąpiło przekrycie panewek przez struktury kostne.

The distribution of reduced stresses for less-cemented endoprostheses in various material and geometric combinations of cups are presented in FIG. 5. In all three tested cases (FIG. 5), there occurred the localization of maximal stresses of 8 MPa in head, neck and in upper part of stem zone. The stresses in the further value of stem of these endoprostheses had similar distribution and values: in the final part of stem, the stresses of 1.8 MPa, and in middle part of 1.2 MPa. In the direct contact of titanium stems with femoral bone, in all three cases, there performed stresses of 1.2-1.8 MPa. It was a profitable situation because such values of stresses did not cause the phenomenon of stress shielding but favored osteointegration. In the case of endoprosthesis with three-layer cup (FIG. 5a) the range of maximal stresses in head was lower than in endoprostheses with two-layer cup (FIG. 5b). In the three-layer cup (FIG. 5a, 5b) there affirmed

the concentration of zone of maximal stresses in the corundum layer. The stresses in the next, polyethylene layer had considerably lower values than in the case of the two-layer cup (FIG. 5b, 6b). In the femoral bone, the further decrease of stresses to value 3 MPa followed. It is necessary to say that corundum, in the range of stresses and tribological parameters, becomes the material of incomparably higher wear resistance than ultra high molecular weight polyethylene. The higher values of pressure in the association with corund-corund will have less destructive effect on the construction of endoprosthesis



**RYS. 5. Mapy rozkładu naprężeń zredukowanych w przekrojach pionowych, w endoprotezach z głowami z  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o różnej średnicy skojarzonych z wariantowymi rozwiązaniami panewek: a) głowa o średnicy Ø28 mm - panewka trójwarstwowa  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti, b) głowa o średnicy Ø28 mm - panewka dwuwarstwowa PE-Ti, c) głowa o średnicy Ø32 mm - panewka dwuwarstwowa PE-Ti.**

**FIG. 5. The maps of stress decompositions reduced in vertical sections in endoprosthesis with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  heads of different diameter mated with variant collection of cups: a) head at diameter Ø28 mm – three-layered  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti, b) head at diameter Ø28 mm – two-layered PE-Ti, c) head at diameter Ø32 mm – two-layered PE-Ti.**

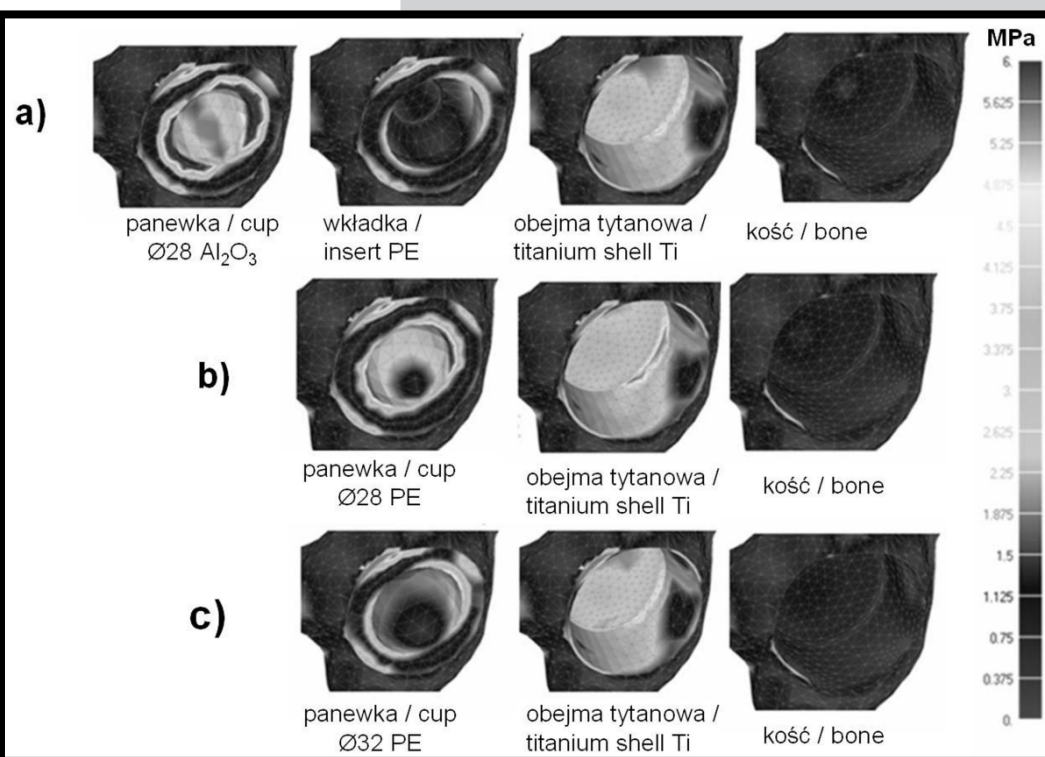
than lower values of pressure in the association with corund-polyethylene. In the endoprostheses (Ø28 mm and Ø32 mm) with the specific cup from polyethylene (FIG. 5b,c) there affirmed the characteristic zones of concentration of stresses in the upper and lower part of cup zone (in the roof and bottom of cup). Moreover, in the FIG. 5b,c, the endoprostheses with specific cups from polyethylene had the characteristic zones of concentration of maximal stresses including polyethylene layer and titanium shell. In the case of head Ø32 mm (FIG. 5c, 6c) associated with specific up from polyethylene the range and values of stresses in the cup were lower than for head Ø28 mm (FIG. 5b, 6b). Such situation resulted from the increase of surface contact head-cup. In the FIG. 5, for all considered cases, there were zones of maximal stress of concentration on the edge of bone bed – in the area, where with regard to anatomical conditions, the cover of the cups by bone structures did not appear.



RYS. 6 przedstawia mapy rozkładów naprężeń na granicach poszczególnych warstw panewek modułowych oraz w obszarze kontaktu obejmującej strukturę kości miednicznej. W panewkach dwuwarstwowych (RYS. 6b,c), w panewce właściwej wykonanej z PE występował asymetryczny owalny rozkład naprężeń w strefie ruchowej ale o znacznie mniejszej koncentracji niż w przypadku panewki trójwarstwowej (RYS. 6a). Maksymalne naprężenia w panewkach dwuwarstwowych w tym obszarze wynosiły 5,5 MPa dla panewki o średnicy wewnętrznej  $\varnothing 28$  mm oraz 4 MPa dla panewki o średnicy  $\varnothing 32$  mm. Dla panewki trójwarstwowej w strefie ruchowej maksymalne naprężenia wynosiły 8 MPa. Dla panewki właściwej z PE o średnicy wewnętrznej  $\varnothing 28$  mm charakterystyczny był wzrost naprężeń w strefie kontaktu tytanowej obejmy z kością w stosunku do naprężeń w panewce właściwej z  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o średnicy  $\varnothing 28$  mm (RYS. 6a,b). We wszystkich analizowanych obiektach badań (RYS. 6) rozkłady naprężeń w strefie kostnej były bardzo podobne i obejmowały zakres od  $0,5 \div 1$  MPa. Naprężenia były zatem przenoszone na struktury kostne co mogło umożliwiać proces remodelingu i osteointegracji.

Na RYS. 7 przedstawiono rozkłady przemieszczeń wypadkowych w różnych kombinacjach materiałowych i geometrycznych panewek. Największy wzrost przemieszczeń w strefie współpracy ruchowej występował w przypadku skojarzenia twardej głowy z polietylenową panewką  $\varnothing 28$  mm (RYS. 7b). W przypadku zastosowania polietylenowej panewki o zwiększonej średnicy  $\varnothing 32$  mm (RYS. 7c) następował spadek przemieszczeń porównywalny z rozkładem w endoprotezie z korundową głową i panewką o średnicy  $\varnothing 28$  mm (RYS. 7a). W rozwiązaniach konstrukcyjnych endoprotez: twarda, korundowa głowa współpracująca z dwuwarstwową panewką: polietylen-tytan – występowało tłumienie przemieszczeń w strukturze polietylenu. W warunkach eksploatacji skutkiem tego zjawiska jest proces plastycznej deformacji i owalizacji panewki polietylenowej.

W panewkach o budowie trójwarstwowej uzyskano lokalizację naprężeń maksymalnych w strefie głowy i trzpienia endoprotezy z nieznacznym przechodzeniem naprężeń maksymalnych do pierwszej warstwy panewki. Można zauważyć, że jest to układ sprzyjający współpracy tribologicznej głowy i panewki – nie będzie powodował przyspieszonego zużycia w porównaniu do rozwiązań z panewką dwuwarstwową.

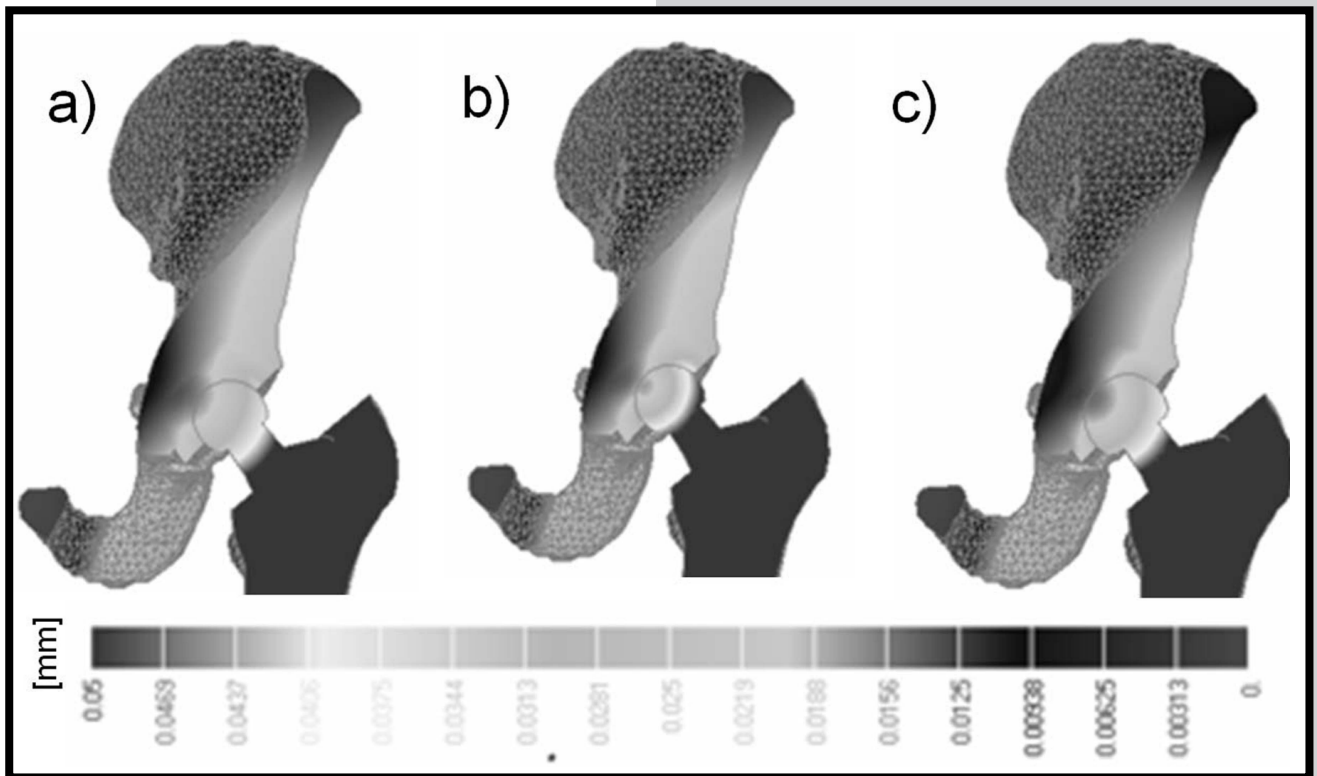


**RYS. 6. Mapy rozkładu naprężeń zredukowanych na granicach poszczególnych warstw komponenty panewkowej w endoprotezach z głowami z  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o różnej średnicy skojarzonych z wariantowymi rozwiązaniami panewek: a) głowa o średnicy  $\varnothing 28$  mm - panewka trójwarstwowa  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti, b) głowa o średnicy  $\varnothing 28$  mm - panewka dwuwarstwowa PE-Ti c) głowa o średnicy  $\varnothing 32$  mm - panewka dwuwarstwowa PE-Ti.**

**FIG. 6. The maps of stress decompositions reduced on boundaries of separate layers of cup components in endoprosthesis with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  heads about different diameter mated with variant collection of cups: a) head at diameter  $\varnothing 28$  mm – three-layered  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti, b) head at diameter  $\varnothing 28$  mm – two-layered PE-Ti, c) head at diameter  $\varnothing 32$  mm – two-layered PE-Ti.**

FIG. 6 presents the maps of distribution of stresses on the borders of particular layers of the modular cups and in the range of contact of titanium shell with pelvis bone structure. In the two-layer cups (FIG. 6b,c), in the cup made from polyethylene, there occurred asymmetrical, oval distribution of stresses in the movement zone, but of much lower concentration than in the case of three-layer cup (FIG. 6a). The maximal stresses in two-layer cups in this zone amounted 5.5 MPa for cup of the internal diameter  $\varnothing 28$  mm and 4 MPa for cup of the diameter  $\varnothing 32$  mm. The maximal stresses in movement zone amounted 8 MPa for three-layer cup. There was characteristic increase of stresses in contact zone of titanium shell with bone for specific cup made from PE of the inside diameter  $\varnothing 28$  mm in relation to stresses in specific cup made from  $\text{Al}_2\text{O}_3$  of the diameter  $\varnothing 28$  mm (FIG. 6a,b). In all analyzed tested objects (FIG. 6) the distribution of stresses in the bone zone were very similar and included the range from  $0.5 \div 1$  MPa. The stresses were transferred on the bone structures. So, it enabled remodeling and osteointegration.

FIG. 7 presents the distribution of resultant displacements in various material and geometry combination of cups. The highest increase of displacements in the movement cooperation of zone occurred in the case of association of the hard head with polyethylene cup  $\varnothing 28$  mm (FIG. 7b). In the case of using polyethylene cup of the increased diameter  $\varnothing 32$  mm (FIG. 7c) there followed decrease of displacements comparable with distribution in the endoprostheses with head and cup made from corundum of diameter  $\varnothing 28$  mm (FIG. 7a). In the construction solutions of endoprostheses:



**RYS. 7. Mapy rozkładu przemieszczeń wypadkowych w przekrojach pionowych, w endoprotezach z głowami  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o różnej średnicy skojarzonych z wariantowymi rozwiązaniami panewek: a) głowa o średnicy  $\varnothing 28$  mm - panewka trójwarstwowa  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti, b) głowa o średnicy  $\varnothing 28$  mm - panewka dwuwarstwowa PE-Ti, c) głowa o średnicy  $\varnothing 32$  mm - panewka dwuwarstwowa PE-Ti.**

**FIG. 7. The maps of resultant displacements in vertical sections in endoprosthesis with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  heads of different diameter mated with variant collection of cups: a) head at diameter  $\varnothing 28$  mm – three-layered  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti, b) head at diameter  $\varnothing 28$  mm – two-layered PE-Ti, c) head at diameter  $\varnothing 32$  mm – two-layered PE-Ti.**

Nowe rozwiązania konstrukcyjne poprzez zastosowanie trójwarstwowej budowy panewek ze współpracą tribologiczną: twarda głowa – twarda panewka zmniejszyły asymetrię przemieszczeń w strefie mocowania panewki. Należy zwrócić uwagę, że zbyt daleko posunięte przesztynwienie układu głowa – panewka może mieć również niekorzystny wpływ na podatność kostnej strefy implantacji, gdyż w przypadku obniżenia gęstości i wytrzymałości struktur kostnych pacjenta (podeszły wiek lub osteoporoza) może powodować przekroczenie progu fizjologicznej wydolności tkanek.

Dla dokładniejszej analizy przemieszczeń, symulację przeprowadzono przy kolejno wzrastających obciążeniach złożonych, z równoczesnym zagęszczeniem siatki elementów skończonych. Na RYS. 8 przedstawiono rozkłady przemieszczeń wypadkowych i deformacji dla endoprotezy: trzpień Ti6Al7Nb, głowa z  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , - trójwarstwowa panewka  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti w warunkach zmiany położenia środka ciężkości ciała człowieka wynikającego z lokomocji.

Na RYS. 9 przedstawiono rozkłady przemieszczeń wypadkowych i deformacji dla endoprotezy: trzpień Ti6Al7Nb, głowa z  $\text{ZrO}_2$  – trójwarstwowa panewka  $\text{ZrO}_2$ -PE-Ti w takich samych warunkach jak dla endoprotezy z korundem. W przypadku trójwarstwowych panewek maksymalne przemieszczenia o wartościach 0,05 mm zlokalizowane były w dachu i dole panewek, przy czym zasięg przemieszczeń maksymalnych dla panewki z ceramiką cyrkonową (RYS. 9) był znacznie mniejszy niż dla panewki z korundem (RYS. 8). W obu przypadkach w warstwie polietylenu następowało tłumienie przemieszczeń. Nie wydostawały się one poza obszar tytanowej obejmy. W warunkach obciążeń fizjologicznych strefa kontaktu: endoproteza-łoże kostne pozbawiona była mikropzemieszczeń.

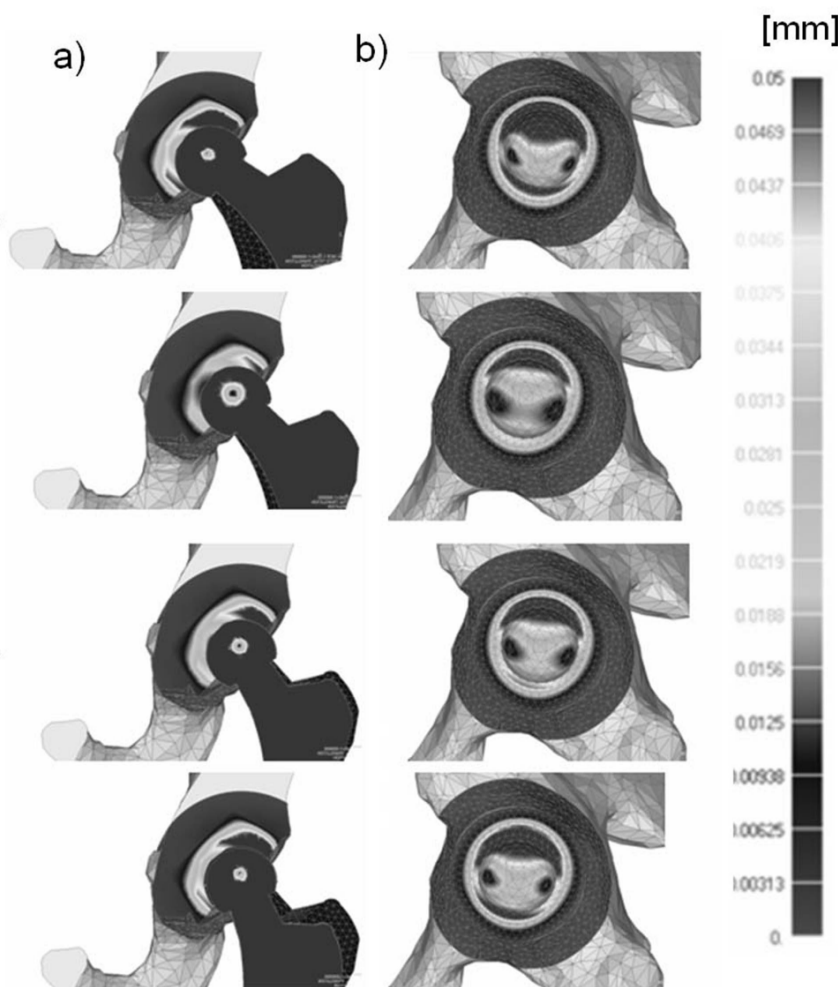
hard, corundum head cooperating with two-layer cup: polyethylene-titanium – there occurred damping of the displacements in the polyethylene structure. In the conditions of exploitation, the effect of this occurrence is the process of plastic deformation and ovalization of polyethylene cup.

In the cup of three-layer structure, the localization of maximal stresses in head and stem zone was received with inconsiderable transfer of maximal stresses to the first layer of cup. It can be noticed that there is the configuration supporting the tribological cooperation of head and cup. It will not cause the accelerated wear as compared with the solutions of two-layer cup.

The new construction solutions, using three-layer cups with tribological cooperation: hard head – hard cup, reduced the asymmetry of displacements in the fixing cup zone. It is necessary to pay attention to the fact that too large redundancy of system head – cup may also have disadvantageous influence on the flexibility of the bone implantation zone, because in the case of decrease of density and resistance of the bone structure of a patient (advanced in years, osteoporosis). Furthermore, it may cause crossing sill of physiological efficiency of tissues.

To achieve more accurate analysis of displacements, the simulation showing the successively expanding complex loads with simultaneous concentration of mesh of finite elements was carried out. FIG. 8 presents the distribution of resultant displacements and deformation for endoprosthesis: stem Ti6Al7Nb, head from  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , three-layer cup  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti in the conditions of change of position of centre of gravity of the human body coming from locomotion.

Wybrane kroki przy narastaniu obciążenia złożonego i ruchu kończyny w pł. strzałkowej /  
 The levels of increase of the complex load and motion of limb in fibular plane



**RYS. 8.** Mapy rozkładów przemieszczeń wypadkowych i deformacji w warunkach narastającego obciążenia, dla panewki trójwarstwowej z korundem, uzyskane w analizie nieliniowej. Endoproteza składa się z: głowy  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o średnicy  $\varnothing 28$  mm osadzonej na trzpieniu  $\text{Ti6Al7Nb}$  i trójwarstwowej panewki  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti. Na kolejnych wizualizacjach przedstawiono: a) wybrane przekroje wzdłużne przez endoprotezę i struktury kostne, b) w tych samych fazach widoki na panewkę od strony kontaktu z głową.

**FIG. 8.** The maps of resultant displacements and deformations in conditions of increasing load for tree-layered cups with corundum, obtained in non-linear analysis. The endoprosthesis consists of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  head at  $\varnothing 28$  mm seated on  $\text{Ti6Al7Nb}$  stem and three-layered cup  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -PE-Ti. The following visualizations present: a) selected longitudinal sections through endoprosthesis and bone structures, b) the views on cup from contact side with head of endoprosthesis in the same phases.

Własności przeciwzużyciowe materiałów wchodzących w bezpośredni kontakt tribologiczny, mogą znacznie wydłużyć żywotność całego implantu. Ocena tribologicznego zużycia endoprotez jest związana na pewno z charakterem przeniesienia obciążeń w kontakcie głowy i panewki. Zapewnienie podatności połączenia ślizgowego (zbliżonego do struktur naturalnych) przy równoczesnej odporności na zużycie abrazyjne (attrition) jest najbardziej preferowanym rozwiązaniem. Na pewno gorszym wariantem w aspekcie tribologicznym będzie zapewnienie podatności wytrzymałościowej z równoczesnym występowaniem zużycia abrazyjnego (zużycie w obecności dodatkowego materiału np. pochodzącego ze ścierania).

there occurs the physical erosion as a result of which the transudate of tissue in the conditions of loads transfer will cause disstopping of irregularity of surface in the surface layer of head and cup.

## Conclusions

On the basis of tests, the following conclusions can be drawn:

1. The elaborated procedure of building complex models that project biological structure on the basis of three-dimensional reconstruction from computer tomography and virtually positioned implant can comprise the practical element of the system of selection of endoprostheses for an individual patient.

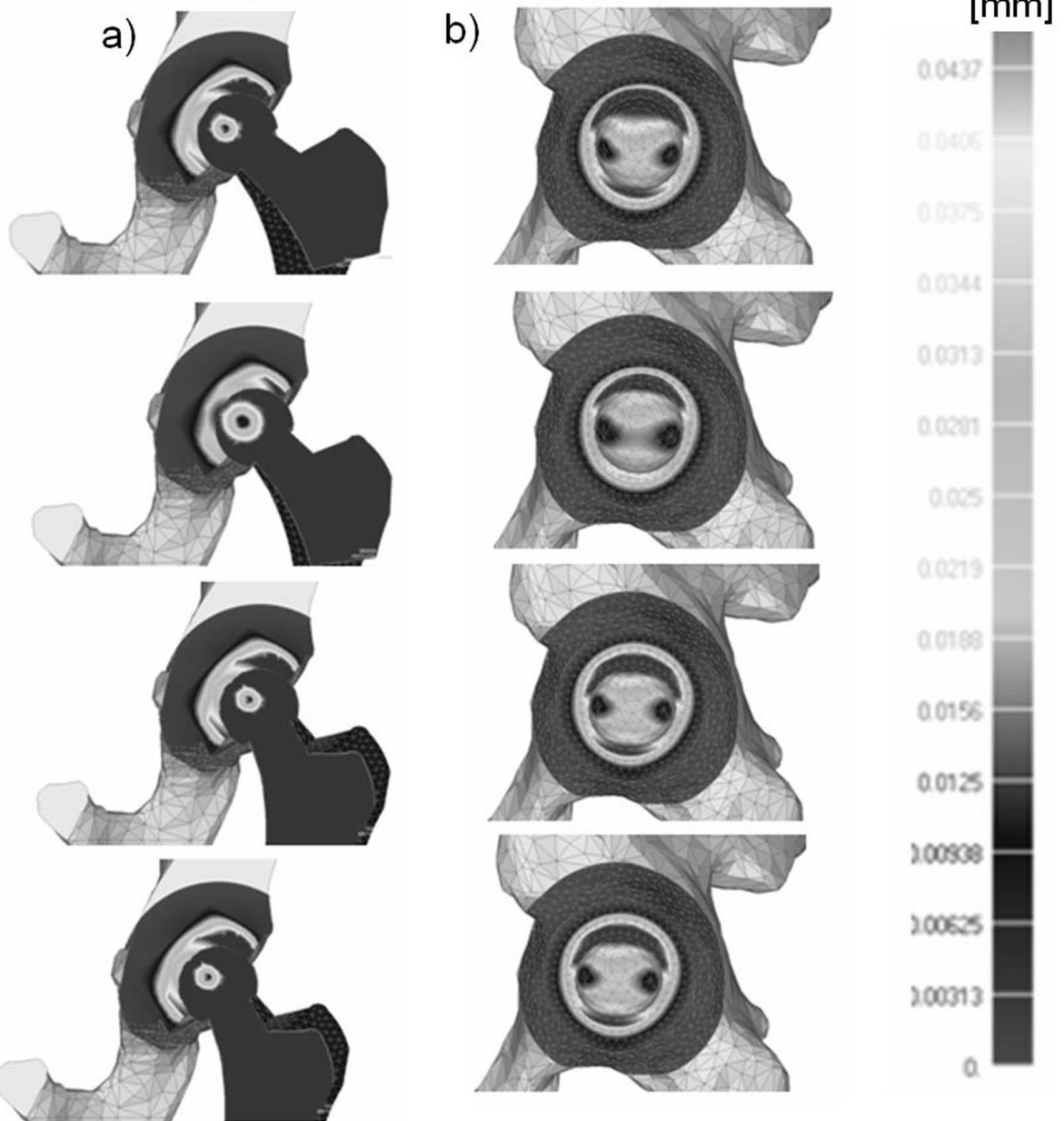
FIG. 9 presents the distribution of resultant displacements and deformation for endoprosthesis: stem  $\text{Ti6Al7Nb}$ , head from  $\text{ZrO}_2$  – three-layer cup  $\text{ZrO}_2$ -PE-Ti in the same conditions as for endoprosthesis with corundum. In the case of three-layer cups, the maximal displacements of value 0.05 mm were localized in the roof and in the hole of cups, but the range of maximal displacements for cup with corundum ceramics (FIG. 9) was much lower than for cup with corundum. In both cases, in polyethylene layer there followed the damping of displacements. They did not get out from the pose zone of titanium shell. In the conditions of physiological loads, the contact zone: endoprosthesis-bone bed was devoid of microdisplacements.

The antiwear properties of materials that enter into the direct tribological contact may considerably increase the vitality of the whole implant. The estimation of tribological wear of endoprostheses is connected with the character of transfer of loads in the contact of head and cup. The reassurance of flexibility of sliding connection (similar to natural structures) by simultaneous abrasive wear resistance is the most preferred solution. It is certain that the worse variant in the tribological aspect will be the assurance of strength flexibility with simultaneous occurrence of the abrasive wear (the wear in the presence of additional materials, for example descended from attrition).

It is necessary to realize that in the case of endoprostheses one can find the third kind of wear – erosion wear of physical and chemical character. The transudate of tissue gets into the cooperating area of head and cup. It causes the chemical reaction on biomaterials and relaxation of zone of surface layer. At the same time



Wybrane kroki przy narastaniu obciążenia złożonego i ruchu kończyny w pł. strzałkowej /  
 The levels of increase of the complex load and motion of limb in fibular plane



**RYS. 9.** Mapy rozkładów przemieszczeń wypadkowych i deformacji w warunkach narastającego obciążenia, dla panewki trójwarstwowej z ceramiką cyrkonową, uzyskane w analizie nieliniowej. Endoproteza składa się z: głowy  $ZrO_2$  o średnicy  $\varnothing 28$  mm osadzonej na trzpieniu  $Ti6Al7Nb$  i trójwarstwowej panewki  $ZrO_2$ -PE-Ti. Na kolejnych wizualizacjach przedstawiono: a) wybrane przekroje wzdłużne przez endoprotezę i struktury kostne, b) w tych samych fazach widoki na panewkę od strony kontaktu z głową.

**FIG. 9.** The maps of resultant displacements and deformations in conditions of increasing load for tree-layered cups with corundum, obtained in non-linear analysis. The endoprosthesis consists of  $ZrO_2$  head at  $\varnothing 28$  mm seated on  $Ti6Al7Nb$  stem and three-layered cup  $ZrO_2$ -PE-Ti. The following visualizations present: a) selected longitudinal sections through endoprosthesis and bone structures, b) the views on cup from contact side with head of endoprosthesis in the same phases.

Należy zdawać sobie sprawę, że w przypadku endoprotez występuje jeszcze trzeci rodzaj zużycia – zużycie erozyjne o charakterze fizycznym i chemicznym. Przesiek tkankowy dostaje się w obszar współpracy głowy i panewki. Powoduje on chemiczne oddziaływanie na biomateriały i rozluźnienie strefy warstwy wierzchniej. Równocześnie występuje erozja fizyczna, w wyniku której przesącz tkankowy w warunkach przenoszenia obciążeń, będzie powodował rozklinowywanie nierówności powierzchni w warstwie wierzchniej głowy lub panewki.

2. The application of testing models to calculating programs allows to carry the analysis of reduced stresses and resultant displacements in structures of endoprotheses and the proximal parts of femoral bone and pelvis bone.

3. The analysis of biomechanical state in natural hip joint after total alloplastic enables the comparison and estimation of construction solutions of endoprotheses. It also makes possible to estimate the character interaction of artificial hip joint on surrounding bone tissues and determine the overload zones or deficiency of compression.

## Wnioski

Na podstawie badań i analiz można podać następujące wnioski:

1. Opracowana procedura budowy kompleksowych modeli odwzorowujących strukturę biologiczną w oparciu o rekonstrukcję przestrzenną na podstawie CT oraz pozycjonowany wirtualnie implant, może stanowić użyteczne ogniwo systemu doboru endoprotezy dla potrzeb indywidualnego pacjenta.

2. Aplikacja modeli badawczych do programów liczących pozwala na przeprowadzenie analizy naprężeń zredukowanych i przemieszczeń wypadkowych w strukturach endoprotez oraz części bliższej kości udowej i kości miednicznej.

3. Analiza stanu biomechanicznego w stawie biodrowym po całkowitej alloplastyce umożliwia porównanie i ocenę rozwiązań konstrukcyjnych endoprotez, pozwala ocenić charakter oddziaływania sztucznego stawu na otaczające tkanki kostne i wyznaczyć strefy przeciążenia lub braku kompresji.

4. W przeprowadzonych obliczeniach i symulacjach stwierdzono, że parametry wytrzymałościowe materiałów konstrukcyjnych endoprotez dalekie były od stanu wyłączenia. W strukturach kostnych nie obserwowano stref stress shielding ani fizjologicznego przeciążenia tkanek.

5. W dwuwarstwowych panewkach przemieszczenia były tłumione w warstwie polietylenu, ale w strefie kontaktu obejmującej tkankę posiadały jeszcze takie wartości, które mogły powodować obłuzowanie panewek w strukturach kostnych. Dodatkowo w tego rodzaju panewkach występowały przemieszczenia boczne, które powodowały owalizację i zużycie.

6. W trójwarstwowych panewkach obserwowano korzystniejszy stan biomechaniczny przy przekazywaniu naprężeń w kolejnych warstwach, w porównaniu do panewek dwuwarstwowych. Koncentracja naprężeń o największych wartościach występowała w korundowej głowie i korundowej panewce właściwej. Spadek wartości naprężeń następował w warstwie polietylenu, a w strefie kontaktu tytanowej obejmującej ze strukturami kostnymi występowały naprężenia o małych wartościach, które jednak mogły stymulować procesy osteointegracji. Równocześnie w tej strefie nie stwierdzono mikroprzemieszczeń, które mogłyby powodować obłuzowanie obejm.

7. Z porównania panewek trójwarstwowych wynika, że optymalnym rozwiązaniem w aspekcie wytrzymałości, tribologii i oddziaływania na struktury kostne i tribologii jest konstrukcja warstwowa o głowie i panewce właściwej z tlenku cyrkonu stabilizowanego itrem.

## Podziękowania

*Autorzy pragną podziękować Panu doktorowi Rajmundowi Rajewskiemu za współpracę w analizie przypadków wytypowanych do zabiegu alloplastyki stawu biodrowego.*

4. In the conducted solutions and simulations, it was identified that the strength parameters of constructive materials of endoprostheses were distant from the effort state. In the bone structures there were neither stress shielding zones nor physiological overload of tissues observed.

5. In the two-layer cups, the displacements were damped in the polyethylene layer but in the contact zone titanium shells with bone tissue had also such values that could cause loosening of cups in bone structure. What is more, in these kinds of cups side displacements occurred and that caused ovalization and wear.

6. In the three-layer cups, as compared with two-layer cups, there observed more profitable biomechanical state when transferring the stresses in consecutive layers. The concentration of stresses of the highest values occurred in corundum head and corundum specific cup. The decrease of values of stresses followed in the polyethylene layer and in the contact zone of titanium shell with natural bone structures stresses of low values occurred. That could stimulate the processes of osteointegration. Simultaneously, in this zone, microdisplacements which could cause loosening of titanium shell were not affirmed.

7. The comparison of three-layer cups suggests that the optimal solution in the aspect of strength, tribology and interaction on bone structures is three-layer construction of head and specific cup made from zirconium dioxide stabilized of yttrium.

## Acknowledgments

*The authors thank dr Rajmund Rajewski for cooperation in the analysis of cases selected to alloplastic of hip joint.*

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Ryniewicz A. M.: Analiza mechanizmu smarowania stawu biodrowego człowieka. Monografia nr 111, ISSN 0867-6631 UWND AGH Kraków 2002.
- [2] Ryniewicz A. M.: Analiza geometrii strefy współpracy biologicznej w aspekcie tribologii i choroby zwyrodnieniowej stawów oraz opracowanie teoretycznych podstaw do konstrukcji endoprotez. Projekt badawczy nr 5T07B 00124 KBN 2006.
- [3] Czerwiński E.: Problemy realoplastyki rewidacyjnej stawu biodrowego w Polsce i na świecie. XXXIII Scientific Congress of Polish Orthopedic and Traumatology Society, Kraków, Skinder s.c. 2000, s. 35.
- [4] Ryniewicz A.M., Madej T.: Komputerowe modelowanie współpracy w endoprotezie stawu biodrowego, Przegląd Lekarski nr 61, 2004, ISSN 1731-1381.
- [5] Bergman G., Deuretzbaher G., Heller M., Graichen F., Rohlmann A., Strauss J., Duda G. N.: Hip contact forces and gait patterns from routine activities. Journal of Biomechanics 34 (2001), 859-871.
- [6] Będziński R., Ściagała K.: Biomechanika stawu biodrowego i kolanowego. Tom 5 Biocybernetyka i inżynieria rehabilitacyjna. red. tomu Będziński R. Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2004.
- [7] Będziński R.: Biomechanika inżynierska Zagadnienia wybrane. Oficyna wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997.
- [8] Ryniewicz A. M., Madej T.: The tribology tests of layers have been obtained by chemical vapour deposition (CVD), Mechanics 2000 Proceedings of the International Scientific Conference, Politechnika Rzeszowska, Czerwiec 2000, Scientific Bulletions of Rzeszów University of Technology No 179 Mechanics 54 (s.69-78.).
- [9] Cwanek J.: The amplitude parameters of pivot and cement surfaces Weller endoprosthesis, Problems of Tribology, Nr 1, 2005, s. 149.
- [10] Madej T., Ryniewicz A.M.: The researches of resistance on abrasive wear of biocompatible films have been obtained by chemical vapour deposition (CVD), Structures - Waves - Biomedical Engineering Kraków 2002 vol. XI, no 3, s. 187-197.

# WPŁYW PROMIENIOWANIA ELEKTRONOWEGO NA BIORESORBOWALNE TERPOLIMERY ZAWIERAJĄCE PAKLITAKSEL

MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>1\*</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>1</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>,  
HENRYK JANECZEK<sup>1</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
POLSKA AKADEMIA NAUK,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

<sup>2</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

\* E-MAIL: MONIKA.MUSIAL-KULIK@CMPW-PAN.EDU.PL

## Streszczenie

Sterylicacja jest bardzo ważnym czynnikiem uzależniającym przydatność materiałów do zastosowań medycznych. Obiecującą metodą sterylizacji wydaje się być promieniowanie wiązką elektronową. Celem badania była analiza wpływu promieniowania elektronowego (EB) na terpolimery zawierające paklitaksel. Dwa typy materiałów użyto do przygotowania matryc zawierających 5 i 10% leku, jak również matryc bez leku: poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-ε-kaprolakton) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) oraz poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-węglan trimetyleny) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC). Wszystkie otrzymane matryce badano przed i po procesie elektronowego napromieniania dawką 25 kGy za pomocą spektroskopii NMR, DSC i GPC. Nie wykazano różnic w składzie komonomerów, temperaturze zeszklenia, liczbowo średniej masie cząsteczkowej jak również w rozrzucie mas cząsteczkowych (dyspersyjność) pomiędzy matrycami otrzymanymi z tego samego typu terpolimeru przed procesem sterylizacji. Promieniowanie elektronowe spowodowało spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej oraz temperatury zeszklenia. Zmiany w składzie komonomerów zauważono tylko w przypadku matryc z P(LA:GA:Cap), co może sugerować mniejszą odporność jednostek kaproilowych na sterylizację.

**Słowa kluczowe:** bioresorbowalne terpolimery, paklitaksel, promieniowanie elektronowe, sterylizacja, polimery z pamięcią kształtu

[Inżynieria Biomateriałów, 94, (2010), 24-27]

## Wprowadzenie

Ze względu na anty-proliferacyjne właściwości paklitakselu, może on zmniejszać lub hamować proliferację i migrację komórek mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych, a także stan zapalny, które stanowią główną przyczynę restenozy w stencie [1,2]. Dlatego też dodatek paklitakselu uwzględniany jest w badaniach nad nową generacją całkowicie bioresorbowalnych stentów lub pokryw stentów. Polimerowe systemy kontrolowanego uwalniania leków muszą spełniać wiele kryteriów zanim zostaną zaimplantowane do ludzkiego organizmu. Muszą być biokompatybilne, degradować do nietoksycznych produktów, mieć odpowiednie właściwości mechaniczne i umożliwiać precyzyjne uwalnianie leku. Materiały takie powinny być też łatwe w sterylizacji.

# THE INFLUENCE OF ELECTRON BEAM RADIATION ON BIORESORBABLE TERPOLYMERS CONTAINING PACLITAXEL

MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>1\*</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>1</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>,  
HENRYK JANECZEK<sup>1</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
34 SKŁODOWSKA-CURIE ST, ZABRZE 41-819, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
1 NARCYZOW ST, SOSNOWIEC 41-200, POLAND

\* E-MAIL: MONIKA.MUSIAL-KULIK@CMPW-PAN.EDU.PL

## Abstract

Sterilization is a very important factor determining usefulness of materials for medical application. The promising method of sterilization seems to be electron beam radiation. The aim of this study was to analyze the influence of the EB radiation on terpolymers containing paclitaxel. Two types of materials were used to prepare three kinds of matrices – with 5% and 10% of paclitaxel as well as drug free matrices. The selected terpolymers were: poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) and poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC). All of the obtained matrices were investigated before and after electron beam (EB) irradiation with the dose of 25 kGy with the use of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, DSC and GPC. There were no differences in comonomer molar ratio, glass transition temperature, the number average molecular weight and dispersity index between non-irradiated matrices prepared from the same terpolymer type, regardless paclitaxel content. EB radiation caused decrease of the number average molecular weight as well as the glass-transition temperature. The changes of comonomer units' ratio were noticed only in the case of P(LA:GA:Cap) matrices that may suggest lower susceptibility to sterilization of caproil units.

**Keywords:** bioresorbable terpolymers, paclitaxel, electron beam radiation, sterilization, shape memory polymers

[Engineering of Biomaterials, 94, (2010), 24-27]

## Introduction

Paclitaxel is taken into account in studies on new drug-loaded totally bioresorbable coronary stents or stent coatings. It was confirmed that paclitaxel has anti-proliferative properties and thus, may reduce or inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and migration as well as inflammatory response that constitute the predominant cause of in-stent restenosis [1,2]. Polymeric controlled drug delivery systems must fulfill many requirements before implantation into human body. They must be biocompatible, degrade to non-toxic products, have appropriate mechanical properties and enable sustained drug release. They should also be sterilizable.



Materiały medyczne mogą być sterylizowane poprzez autoklawowanie, za pomocą tlenu etylenu oraz metodami jonizacji, takimi jak promieniowanie gamma, promieniowanie jonowe, promieniowanie X czy wiązką elektronów o wysokiej energii. Sterylizacja polimerów w warunkach podwyższonej temperatury powoduje utratę ich właściwości mechanicznych, podczas gdy pozostałości tlenu etylenu są trudne do usunięcia [3,4]. Stwierdzono, że promieniowanie gamma przyspiesza degradację bioresorbowalnych polimerów, co może powodować również szybsze uwolnienie leku [5]. Z tych względów, promieniowanie wiązką elektronową wydaje się być obiecującym rozwiązaniem problemów.

## Materiały i metody

L-laktyd, glikolid, węglan trimetyleny (TMC) oraz  $\epsilon$ -kapolakton zostały użyte do otrzymania terpolimerów, które wykorzystano do sporządzenia matryc zawierających 5 i 10% paklitakselu oraz matryc niezawierających leku. Polimeryzację z otwarciem pierścienia była prowadzona w masie, w temperaturze 120°C w obecności  $Zr(Acac)_4$ , jako niskotoksycznego inicjatora [6] przy zachowaniu stosunku molowego inicjator/monomery (I/M) równego 1/1000. Terpolimery zsyntezowano Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, PAN w Zabrzu, natomiast czysty paklitaksel zakupiono w LC Laboratories®.

Roztwory różnych terpolimerów w chlorku metylenu mieszano z roztworem zawierającym odpowiednią ilość leku i wlewano na szklaną płytę. Po odparowaniu rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej, suszenie uzyskanych matryc kontynuowano zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wycięto z nich matryce o średnicy 12 mm.

Hermetycznie zamknięte próbki sterylizowano poprzez napromienianie wiązką elektronów o energii 10 MeV emitowaną przez akcelerator elektronowy. Dawka promieniowania wynosiła 25 kGy.

Skład komonomeryczny terpolimerów charakteryzowano na podstawie widm  $^1H$  zarejestrowanych na spektrometrze NMR o wysokiej rozdzielczości (on AVANCE II Ultra Shield Plus, 600 MHz, Bruker). Próbki rozpuszczano w osuszonym DMSO. Tetrametylosilan użyto jako wzorzec wewnętrzny w celu określenia przesunięć chemicznych (ppm).

Liczbowo średnie masy cząsteczkowe ( $M_n$ ) oraz rozrzut mas cząsteczkowych (D) analizowano z wykorzystaniem chromatografu żelowego (Physics SP 8800), stosując chloroform jako rozpuszczalnik w oparciu o standardy polistyrenowe.

Do analizy właściwości termicznych zastosowano metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej. Aparat (TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE) kalibrowano za pomocą indy i galu o wysokiej czystości. Matryce skanowano z szybkością ogrzewania wynoszącą 20°C/min w zakresie od -100°C do 220°C. Temperaturę zeszklenia ( $T_g$ ) wyznaczano z drugiego skanu DSC (po ogrzaniu próbek do temperatury 220°C schładzano je do -100°C poprzez umieszczenie w ciekłym azocie i ponownie ogrzewano do 220°C).

## Wyniki i dyskusja

Celem niniejszego badania było określenie wpływu promieniowania elektronowego na bioresorbowalne matryce zawierające paklitaksel. Matryce bez paklitakselu oraz matryce z 5 i 10% zawartością leku wykonano z dwóch rodzajów terpolimerów: poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko- $\epsilon$ -kapolaktonu) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) oraz poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-węglanu trimetyleny) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC). Dowiedziono, iż materiały tego typu wykazują efekt pamięci kształtu, który może być przydatny w opracowaniu

Medical devices can be sterilized with the use of autoclaving, ethylene oxide or ionizing methods such as gamma irradiation, ion beams, X rays or accelerated electrons. Sterilization of polymers with high temperature decreases their mechanical properties while ethylene oxide residues are difficult to remove [3,4]. It was also reported that gamma irradiation accelerates degradation of biodegradable polymers, which may also cause faster drug release [5]. Due to the drawbacks of those methods, electron beam (EB) radiation seems to be a promising solution.

## Materials and methods

Terpolymers synthesized from L-lactide, glycolide, trimethylene carbonate (TMC) and  $\epsilon$ -caprolactone at the Centre of Polymer and Carbon Materials, PAScs in Zabrze were used to prepare matrices with 5 or 10% of paclitaxel as well as drug free matrices. The ring-opening copolymerization was carried out in bulk at 120°C in the presence of  $Zr(Acac)_4$  as a low toxic initiator [6] with the initiator to monomer molar ratio (I/M) of 1/1000. Pure paclitaxel was purchased from LC Laboratories®.

The solution of various terpolymers in methylene chloride were mixed with the solution of appropriate amount of drug and then cast on a glass plate with the special casting device. After evaporating at ambient temperature, films were dried under reduced pressure. The matrices with dimension of 12 mm were cut from the films and used for the study.

Hermetically sealed samples were irradiated with the accelerating voltage of 10 MeV produced by electron accelerator and the radiation dose of 25 kGy.

Terpolymers composition was characterized by analysis of  $^1H$  spectra recorded at 600 MHz on AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker. Specimens were dissolved in dried DMSO- $d_6$ . Tetramethylsilane was used as an internal standard in order to determine chemical shifts (ppm).

The number average molecular weight and ( $M_n$ ) and molecular mass dispersity (D) were studied by means of gel permeation chromatography (GPC, Physics SP 8800 chromatograph) with the use of chloroform as a solvent.

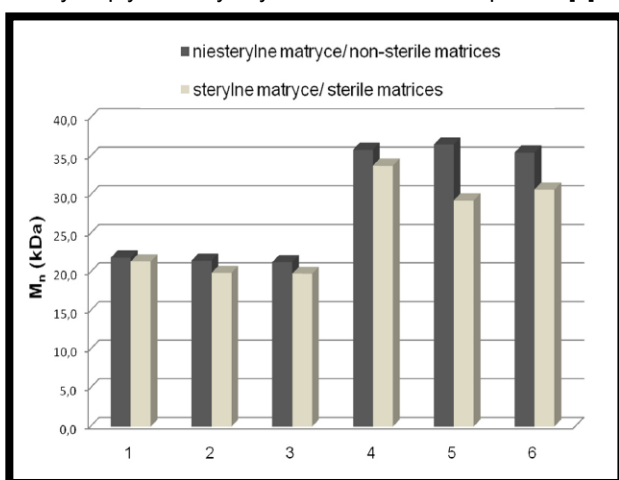
Differential scanning calorimetry (DSC) analysis was carried out with TA DSC 2010 apparatus (TA Instruments, New Castle, DE) calibrated with high purity gallium and indium. The matrices and pure paclitaxel were scanned at a heating rate of 20°C/min in the range of -100°C to 220°C. The glass-transition temperature ( $T_g$ ) of matrices was obtained from the second scan (after heating to 220°C, the specimens were quenched to -100°C under nitrogen atmosphere and then heated again to 220°C).

## Results and Discussions

In this study it was aimed to determine the influence of electron beam radiation on bioresorbable matrices containing paclitaxel. The drug was incorporated into two types of terpolymers: poly(L-lactide-co-glycolide-co- $\epsilon$ -caprolactone) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) and poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC) in order to obtain matrices with 5% and 10% (w/w) of drug. Drug free matrices were also prepared. The purpose of this study was to analyze whether sterilization influences physicochemical properties of matrices. Both terpolymers contained lactidyl and glicolidyl units, but differed in one comonomer. Thus, the effect of sterilization was compared in terpolymer with caproyl units and in terpolymer with carbonate units. It was reported that terpolymers of these types demonstrate shape-memory properties that can be useful in preparing self-expandable biodegradable drug-eluting coronary stents [7,8].

• • • • • samorozprężających się, biodegradowalnych, uwalniających leki stentów naczyniowych [7,8]. Oba terpolimery zawierają jednostki laktydylowe i glikolidylowe, ale różnią się jednym ko monomerem. Określono zatem wpływ dodatku jednostek kaproilowych i węglanowych do polimeru na zwiększenie stabilności i zapobieganie zmianom właściwości fizykochemicznych matryc w wyniku sterylizacji. Celem badania było również określenie, czy sterylizacja wpływa na zmiany właściwości fizykochemicznych matryc oraz zmiany w samej cząsteczce leku.

Porównywano liczbowo średnią masę cząsteczkową ( $M_n$ ) każdej z matryc przed napromienianiem z ( $M_n$ ) matryc sterylnych (RYS. 1). Zauważono, że masa cząsteczkowa uległa zmniejszeniu po procesie radiacji. Matryce wykonane z P(LA:GA:TMC) charakteryzowały się znacznie większym ubytkiem mas cząsteczkowych niż matryce P(LA:GA:Cap). Ponadto, większy spadek  $M_n$  charakteryzował matryce zawierające paklitaksel. Spadek  $M_n$  oraz dyspersji (D) można tłumaczyć degradacją krótkich łańcuchów terpolimerowych, która została indukowana napromienianiem. Ponieważ wszystkie próbki były hermetycznie zamknięte, można wykluczyć wpływ reaktywnych form tlenu na ten proces [9].



**RYS. 1.** Liczbowo średnia masa cząsteczkowa ( $M_n$ ) matryc przed i po procesie sterylizacji.

**FIG.1.** The number average molecular weight ( $M_n$ ) of non-irradiated and irradiated matrices.

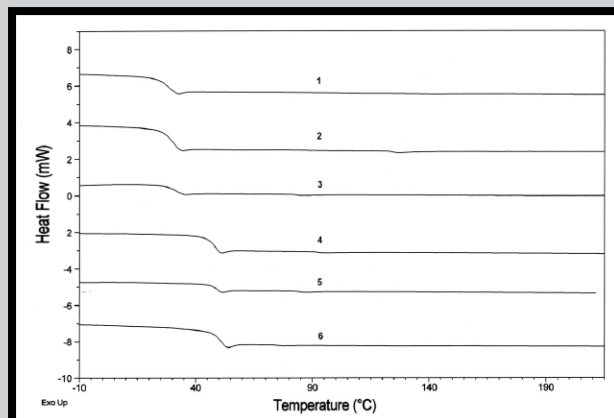
1 – P(LA:GA:Cap), 2 – P(LA:GA:Cap) + 5% of paclitaxel, 3 – P(LA:GA:Cap) + 10% of paclitaxel, 4 – P(LA:GA:TMC), 5 – P(LA:GA:TMC) + 5% of paclitaxel, 6 – P(LA:GA:TMC) + 10% of paclitaxel.

Analiza termogramów nie wykazała punktów topnienia w przypadku próbek przed napromienianiem, wszystkie zatem były całkowicie amorficzne. Temperatura zeszklenia matryc otrzymanych z P(LA:GA:Cap) wynosiła 25°C, a matryc z P(LA:GA:TMC) 45°C. Spadek temperatury zeszklenia wszystkich napromienionych próbek korelował ze spadkiem mas cząsteczkowych. Jakkolwiek, matryce z P(LA:GA:TMC) charakteryzował większy spadek temperatury zeszklenia niż matryc wykonanych z P(LA:GA:Cap), co jest również spowodowane wyższym ubytkiem masy cząsteczkowej. Na termogramach sterylnych matryc zawierających paklitaksel otrzymanych z obydwu rodzajów terpolimerów stwierdzono punkty topnienia, co świadczy o pojawieniu się frakcji krystalicznych podczas promieniowania elektronowego. Trzeba jednak zaznaczyć, iż entalpia topnienia ( $\Delta H_m$ ) była bardzo nieznaczna (około 5,5 J/g) (RYS. 2).

Skład molowy terpolimerów zdeteminowano za pomocą spektroskopii NMR. Nie stwierdzono różnic w składzie komonomerów pomiędzy trzema rodzajami niesterylnych matryc, które otrzymano z obu typów terpolimerów.

The number average molecular weight ( $M_n$ ) of each type of matrices before irradiation was compared with  $M_n$  of sterile matrices (FIG. 1). It was noticed that the number average molecular weight generally decreased after irradiation. The matrices obtained from PLAGATMC characterized more significant decrease of molecular mass than the P(LA:GA:Cap) matrices. Moreover, higher decrease of  $M_n$  was noticed in the case of matrices containing paclitaxel. The decrease of  $M_n$  and molecular mass dispersity (D) can be explained by degradation of short terpolymer chains induced by the radiation. Since all of the specimens were hermetically sealed, the influence of reactive oxygen species (ROS) on the degradation rate was minimised [9].

Differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed that all of the matrices before radiation did not exhibit a melting peak. Thus, all of them were totally amorphous with the glass-transition temperature ( $T_g$ ) of 25°C in the case of P(LA:GA:Cap) and 45°C for P(LA:GA:TMC). The decrease of glass-transition temperature in all of the radiated samples was observed and it corresponded to decrease of molecular weight. However, the P(LA:GA:TMC) matrices characterized higher glass-transition temperature decrease than the P(LA:GA:Cap) matrices, which was connected to higher decrease of the number average molecular weight. The thermograms of sterile paclitaxel-loaded matrices obtained from both kind of materials, very small melting peaks were identified, however the enthalpies of melting ( $\Delta H_m$ ) were very low (about 5,5 J/g). It was assumed the small crystalline phase was formed during EB radiation. However, none of the investigated matrices had the tendency to reconstitution of crystalline parts since melting peaks were not observed during the second scan (FIG. 2).



**RYS. 2.** Termogamy DSC matryc po procesie sterylizacji (otrzymane z drugiego skanu).

**FIG. 2.** DSC thermograms of matrices after sterilization (obtained from the second scan).

1 – P(LA:GA:Cap), 2 – P(LA:GA:Cap) + 5% of paclitaxel, 3 – P(LA:GA:Cap) + 10% of paclitaxel, 4 – P(LA:GA:TMC), 5 – P(LA:GA:TMC) + 5% of paclitaxel, 6 – P(LA:GA:TMC) + 10% of paclitaxel.

Terpolymers' composition was determined by means of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. There were no differences in comonomer molar ratio between 3 kinds of non-radiated matrices (with 5, 10% of paclitaxel and drug free matrices), obtained from each type of investigated terpolymers. The composition of all of the P(LA:GA:TMC) matrices did not change after sterilization, regardless the paclitaxel loading. In the case of all matrices obtained from (poly(L-lactide-co-glycolide-co- $\epsilon$ -caprolactone) (44:32:24)), lactidyl units content increase and caprolyl units decrease was noticed. It can be assumed that caprolyl units are more susceptible to EB radiation than the carbonate ones.

Udział molowy komonomerów wszystkich matryc przygotowanych z P(LA:GA:TMC) nie uległ zmianie po sterylizacji. W przypadku wszystkich matryc sporządzonych z poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-ε-kaprolaktonu) (44:32:24) obserwowano wzrost zawartości jednostek laktydylowych oraz spadek zawartości jednostek kaproilowych. Można przypuszczać, że jednostki kaproilowe są bardziej wrażliwe na promieniowanie elektronowe, niż jednostki węglanowe.

Nie obserwowano istotnych różnic w liczbowo średniej masie cząsteczkowej, rozrzucie mas cząsteczkowych oraz temperaturze zeszklenia pomiędzy sterylnymi matrycami zawierającymi paklitaksel i sterylnymi matrycami bez leku. Ponieważ nie odnotowano zmian w składzie komonomerów matryc otrzymanych z P(LA:GA:TMC), może to wskazywać na mały wpływ obecności paklitakselu na proces sterylizacji. Ponadto, analiza NMR nie wykazała zmian w cząsteczce leku w napromienianych matrycach. Wzrost zawartości jednostek laktydylowych i ubytek jednostek kaproilowych w matrycach wykonanych z P(LA:GA:Cap) może wpływać na szybkość degradacji, a zatem i na profil uwalniania leku.

## Wnioski

Otrzymano trzy rodzaje matryc (z 5%, 10% zawartością leku oraz matryc bez leku) z dwóch typów terpolimerów. Próbkę sterylizowano za pomocą promieniowania elektronowego. Proces sterylizacji matryc z paklitaksem i matryc bez leku nieznacznie wpłynął na liczbowo średnią masę cząsteczkową, rozrzut mas cząsteczkowych oraz właściwości termiczne. Wartości wszystkich tych parametrów uległy obniżeniu po procesie napromieniania. Otrzymane wyniki sugerują, iż zawartość leku nie ma znaczącego wpływu na właściwości fizykochemiczne terpolimerów w czasie sterylizacji. Ponadto, analiza NMR nie wykazała zmian w cząsteczce leku zawartego w napromienianych matrycach. Zmiany w składzie molowym komonomerów obserwowano tylko w przypadku matryc otrzymanych z P(LA:GA:Cap), co może wskazywać na większą wrażliwość jednostek kaproilowych na promieniowanie. To może z kolei mieć wpływ na proces degradacji, a tym samym na uwalnianie paklitakselu z wysterylizowanych matryc.

Wyniki niniejszego badania mogą być pomocne w selekcji metody sterylizacji systemów uwalniających paklitaksel.

## Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach projektu MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-03).

## Piśmiennictwo

- [1] Alexis F., Venkatraman S. S., Rath K. S., Boey F.: In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug-incorporated biodegradable stent matrices, *Journal of Controlled Release* 98 (2004) 67-74.
- [2] Lao L. L., Venkatraman S. S.: Adjustable paclitaxel release kinetics and its efficacy to inhibit smooth muscle cells proliferation, *Journal of Controlled Release* 130 (2008) 9-14.
- [3] Gogolewski S., Mainil-Varlet P.: The effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides. 2. Poly(L/D-lactide) and poly(L/DL-lactide), *Biomaterials* 18 (1997) 251-255.
- [4] Mendes G. C. C., Brandão T. R. S., Silva C. L. M.: Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review, *American Journal of Infection Control* 35 (2007) 574-58.
- [5] Ғалыт С., Bozdağ S., Kağ H. S., Tunçay M., Hýncal A. A.: Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs, *Il Farmaco* 57 (2002) 55-62.

No significant differences between the number average molecular weight ( $M_n$ ), molecular mass dispersity ( $D$ ), glass-transition temperature ( $T_g$ ) of paclitaxel-loaded sterile matrices and drug free sterile matrices were noticed. There were no changes in comonomer molar ratio in the case of P(LA:GA:TMC) matrices before and after sterilization that indicated insignificant effect of paclitaxel content during sterilization. Lactidyl units content increase and caprolyl units decrease of P(LA:GA:Cap) radiated matrices was observed that may influence on the drug release profile. The NMR analysis did not reveal any change in drug molecule after sterilization.

## Conclusions

In this study two terpolymers were used to obtain three types of matrices (with 5%, 10% of paclitaxel and drug free matrices). The matrices were sterilized with the use of EB radiation and investigated. Sterilization of paclitaxel-loaded matrices as well as drug free matrices insignificantly influenced the number average molecular weight ( $M_n$ ), molecular mass dispersity ( $D$ ) and also thermal properties. All of the mentioned parameters decreased after irradiation with the use of electron beam radiation. The obtained results suggested that drug content did not affect significantly on physicochemical properties of terpolymers during sterilization process. Moreover, the NMR analysis did not reveal any change in drug molecule after sterilization. The changes of polymer composition were observed only in the case of P(LA:GA:Cap) matrices, which suggested higher susceptibility to radiation of caprolyl units. This may influence the degradation process and thus, the paclitaxel release from sterilized matrices.

The results of this study may be helpful in selection of sterilization method for paclitaxel delivery terpolymeric systems.

## Acknowledgments

This study has been financially supported by MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-03).


## References

- [6] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J.: Application of zirconium (IV) acetylacetonate to the copolymerization of glycolide with ε-caprolactone and lactide, *Polymer Bulletin* 42 (1999) 131-139.
- [7] Zini E., Scandola M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Shape Memory Behavior of Novel (l-Lactide-Glycolide-Trimethylene Carbonate) Terpolymers, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3661-3667.
- [8] Lu X. L., Sun Z. J., Cai W., Gao Z. Y.: Study on the shape memory effects of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) biodegradable polymers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 395-399.
- [9] Montanari L., Cilurzo F., Valvo L., Faucitano A., Buttafava A., Groppo A., Genta I., Conti B.: Gamma irradiation effect on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam, *Journal of Controlled Release* 75 (2001) 317-330.



# STUDIA PODYPLOMOWE

## Biomateriały – Materiały dla Medycyny

 <p><b>Organizator:</b> Akademia Górniczo-Hutnicza Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów</p> <p><b>Kierownik:</b> Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła</p>	<p><b>Adres:</b> 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 108 lub 107 tel. 12 617 44 48, 12 617 34 41; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl stodolak@agh.edu.pl <a href="http://www.agh.edu.pl/pl/studia-w-agh/studia-podyplomowe/biomaterialy-materialy-dla-medycyny.html">http://www.agh.edu.pl/pl/studia-w-agh/studia-podyplomowe/biomaterialy-materialy-dla-medycyny.html</a></p>
<p><b>Charakterystyka:</b></p> <p>Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: in vitro i in vivo). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.</p>	
<p><b>Sylwetka absolwenta:</b></p> <p>Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny.</p> <p>Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.</p>	
<p><b>Zasady naboru:</b></p> <p>Termin zgłoszeń: od 1 X 2010 r. do 15 I 2011 r. (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń). Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej. Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 108 lub 107. Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Dr inż. Ewa Stodolak (tel. 12 617 34 41, e-mail: stodolak@agh.edu.pl)</p>	
<p><b>Czas trwania:</b> 1 semestr od II 2011 r. do VI 2011 r.</p>	<p><b>Opłaty:</b> 2 000 zł</p>
<p><b>Informacje dodatkowe:</b></p> <p>Zajęcia: 7 zjazdów (soboty-niedziele) co 2 tygodnie. Przewidywana liczba godzin: 120. Przewidywana data rozpoczęcia: 26 II 2011.</p>	